

Herstellung und In-Vitro-Testung einer Polyethylenimin- Beschichtung auf Herniennetzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jacob Erdmann

geboren am 09.07.1985 in Weimar

Gutachter

1. Prof. Dr. med. habil. Utz Settmacher, Universitätsklinikum Jena
2. Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Stefan Schultze-Mosgau, Universitätsklinikum Jena
3. PD Dr. med. Torsten Überrück, St. Agnes-Hospital Bocholt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.02.2013

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
BODIPY	engl. Boron-dipyrromethene
CLSM	engl. Confocal Laser Scanning Microscopy
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	engl. Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EHS	engl. European Hernia Society
ePTFE	expandiertes Polytetrafluorethylen
eV	Elektronenvolt
FBS	engl. fetal bovine serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
H ₂ O	Diwasserstoffmonoxid, Wasser
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M _w	Molekulargewicht
OP	Operation
PBS	engl. phosphate buffered saline, PBS
PE	Polyester
PEI	Polyethylenimin
PET	Polyethylenterephthalat
pH	lat. potentia hydrogenii
PP	Polypropylen
REM	Rasterelektronen Mikroskopie
Sig.	Signifikanz
Tab.	Tabelle
TRITC	engl. Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
UKJ	Universitätsklinikum Jena
XPS	engl. X-ray photoelectron spectroscopy

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	8
2.1 Hernien	8
2.1.1 Definition und Klassifikation von Hernien	8
2.1.2 Epidemiologie und Pathophysiologie von Hernien	9
2.1.3 Entwicklung und aktuelle Verfahren in der Hernienchirurgie	10
2.2. Polymere	14
2.2.1 Polymere allgemein	14
2.2.2 Materialeigenschaften von PE, PP und PTFE	15
2.2.3 Beschichtungen von Polymeren	17
2.2.4 Polyethylenimin	19
3 Ziele der Arbeit	22
4 Material und Methoden	23
4.1 Verwendete Herniennetze	23
4.2 Herstellung der Polyethyleniminbeschichtung	24
4.3 Auswertungsmethoden	25

4.3.1 Elektronenmikroskopie	25
4.3.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)	26
4.3.3 Fluoreszenzmikroskopie	27
4.3.4 Zellproliferationstests	27
4.3.5 Zytotoxizitätstest	28
4.3.6 Statistische Analyse	28
5 Ergebnisse	30
5.1 Elektronenmikroskopische Bewertung der Herniennetze	30
5.2 Nachweis der PEI-Beschichtung mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie	35
5.3 Nachweis der PEI-Beschichtung mittels Fluoreszenzmikroskopie	41
5.4 Proliferationstest	45
5.5 Zellnachweis mittels Elektronenmikroskopie	53
5.6 Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test	54
6 Diskussion	56
6.1 Allgemeine Aspekte	56
6.2 Bewertung der verwendeten Methoden und deren Ergebnisse	57
6.2.1 Bewertung der Herniennetzauswahl	57
6.2.2 Bewertung der statistischen Analyse	57
6.3 Bewertung der Zellproliferation und deren Ergebnisse	58

6.3.1 Bewertung der Fibroblastenproliferation mittels Zellzähler	58
6.3.2 Bewertung der Fibroblastenproliferation mittels Elektronenmikroskopie	59
6.4 Bewertung der Beschichtungsnachweise und deren Ergebnisse	60
6.4.1 Bewertung der Röntgenphotoelektronenspektroskopie	60
6.4.2 Bewertung der Fluoreszenzmikroskopie	62
6.5 Bewertung des Zellvitalitätsnachweises und dessen Ergebnisse	63
6.5.1 Bewertung des MTT-Tests	63
7 Schlussfolgerung	65
8 Literatur- und Quellenverzeichnis	67
Danksagung	VII
Ehrenwörtliche Erklärung	VIII

1 Zusammenfassung

Bauchwandhernien sind mit einer Lebenszeit-Prävalenz von 1,7 % eine der häufigsten Diagnosen in der Chirurgie und verursachen allein in den USA direkte und indirekte Kosten von mehreren Milliarden US-Dollar pro Jahr (Mavros et al. 2011, Jenkins und O'Dwyer 2008). Während Anfang der 1990er Jahre die Lichtenstein-OP das dominierende Verfahren zur Bruchversorgung darstellte, kamen im Laufe der Zeit neue Methoden wie die Mesh-Plug-Operation oder auch die laparoskopische Hernienversorgung hinzu (Zendejas et al. 2012).

Die Einführung von Netzprothesen zur spannungsfreien Bruchoperation konnte die Rezidivraten erheblich reduzieren und gilt deshalb heute als Standard (Schmidbauer et al. 2005). Dieser Paradigmenwechsel bedingte aber auch neue Komplikationen, wie beispielsweise Adhäsionen, Fistelbildung und netzassoziierte Infektionen (Halawish et al. 2010).

Auf Grund dieser nachteiligen Eigenschaften wurden Netzprothesen seit ihrer Einführung durch Usher im Jahr 1963 immer weiter verbessert (Witherspoon und O'Dwyer 2005). Ein Schwerpunkt liegt heute in der Optimierung der verwendeten Polymere und der Entwicklung von Composites, einer Gruppe von teilresorbierbaren bzw. beschichteten Herniennetzen (Scheidbach et al. 2011, Eliason et al. 2011).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine neue Beschichtung mit Polyethylenimin (PEI), eines der am besten untersuchten Polykationen, auf aktuell verwendeten Herniennetzen untersucht (Hu et al. 2010). Die seit langem bekannten, sehr guten Eigenschaften von PEI, die Proliferation, Maturation und Adhäsion von verschiedensten Zelllinien zu stimulieren, waren Gründe für dessen Auswahl (Lelong et al. 1992). Insgesamt wurden 31 Proben von 4 unterschiedlichen Netzen aus Polypropylen (PP), Polyester (PE) und expandierten Polytetrafluorethylen (ePTFE) beschichtet. Dabei ließ sich eine erfolgreiche PEI-Beschichtung besonders gut durch das Verfahren der Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) und mit Hilfe der Zellproliferation nachweisen und statistisch analysieren. Auf dem ePTFE-Netz sowie dem Optilene-Netz (PP) ließ sich nach der Beschichtung ein signifikant vermehrtes Zellwachstum feststellen, welches insbesondere beim Infinit Mesh (ePTFE) stark ausgeprägt war. Auf dem beschichteten PE-Netz waren ebenfalls mehr Fibroblasten nachweisbar, jedoch nicht in statistisch signifikanter Anzahl. Die Toxizität von PEI wurde mittels MTT-Test untersucht, konnte aber bei keiner Probe festgestellt werden.

2 Einleitung

2.1 Hernien

2.1.1 Definition und Klassifikation von Hernien

Bei der Hernie, auch Bruch oder Hernia genannt, handelt es sich laut Definition im Pschyrembel (Willibald Pschyrembel 2011) um eine „[...] Verlagerung von Eingeweideteilen (Bruchinhalt) mit sackartiger Ausstülpung des parietalen Peritoneums (Bruchsack) durch anat. präformierte Lücken od. Schwachstellen (Bruchpforte)“.

Diese kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten wie z. B. Art der Symptomatik (siehe Tabelle 1), Ort der Hernie und Entstehungsmechanismus in verschiedenen Klassifikationen eingeteilt werden.

Tabelle 1 Definition der Hernie nach Symptomatik (Reinpold 2012)

Tab. 1: Definitionen	
Asymptomatische Hernie	Hernie ohne Schmerzen und Beschwerden
Symptomatische Hernie	Hernie, die Schmerzen und Beschwerden verursacht
Nicht reponible Hernie (=eingeklemmte Hernie, inkarziert)	Hernie, deren Bruchsackinhalt nicht in die Bauchhöhle reponiert werden kann (Bruchinhalt = inkarzierte Hernie)
Strangulierte Hernie	Nicht reponible Hernie, die Symptome der Strangulation (Durchblutungsstörung des eingeklemmten Organes / Gewebes) oder des Ileus zeigt

Seit Beginn der Hernienchirurgie wurde eine Vielzahl von Einteilungen vorgeschlagen, wobei besonders im europäischen Raum in den letzten Jahren ein starkes Bestreben nach einer Vereinheitlichung und Vereinfachung bestand. Die European Hernia Society (EHS) favorisiert in ihren aktuellen Leitlinien die Einteilung nach Miserez (Miserez et al. 2007) (siehe Tabelle 2), bzw. die von Campanelli (Campanelli et al. 2006) vorgeschlagene Klassifikation für wieder aufgetretene Hernien.

Tabelle 2 EHS Klassifikation für Leistenhernien (Reinpold 2012)

Ort \ Größe*	1	2	3
Lateral	L1	L2	L3
Medial	M1	M2	M3
Femoral	F1	F2	F3

*Bruchfortendurchmesser gemessen in Fingerbreite

2.1.2 Epidemiologie und Pathophysiologie von Hernien

Die Inzidenz der Bauchwandhernie beträgt weltweit ca. 25 Millionen pro Jahr, wobei allein in Deutschland jährlich ca. 200000 Hernien neu auftreten (Otto 2006). Die Verteilung auf die unterschiedlichen Lokalisationen der Bauchwandhernie zeigt Abbildung 1.

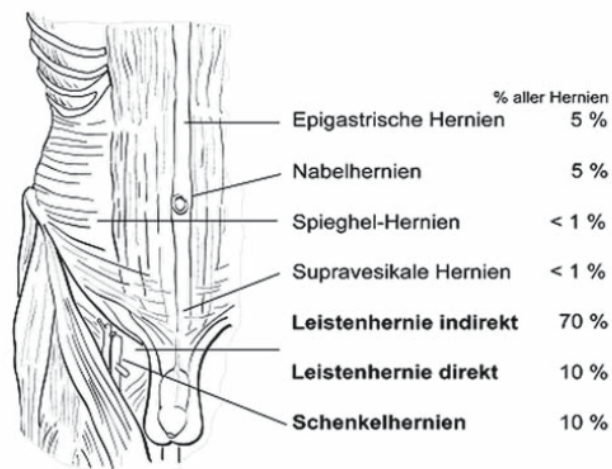


Abbildung 1 Häufigkeitsverteilung der Bauchwandhernie nach Lokalisation (Zimmerman 1963)

Als Ursache für die Entstehung einer Hernie ist heute die Manifestation einer Bindegewebserkrankung mit Störung im Kollagenstoffwechsel allgemein anerkannt (Ritz und Buhr 2006). Eine Reihe weiterer Risikofaktoren kann die Entstehung eines Bruches beschleunigen. Hierzu zählen z. B. Nikotinabusus, positive Familienanamnese für Hernien, Leberzirrhose, erhöhter intraabdomineller Druck oder auch eine offener Processus vaginalis (Reinpold 2012).

Neben der möglichen Einschränkung in der Lebensqualität des Patienten durch Schmerzen, Druckgefühl oder auch kosmetische Probleme, ist es vor allem die Einklemmungsgefahr mit ihren Folgen (Darmgangrän, Peritonitis), die das Hauptkriterium für die Indikationsstellung für ein operatives Vorgehen darstellt. Lediglich bei kleinen, asymptomatischen Hernien ist ein wachsaues Zuwarten unter regelmäßiger Kontrolle möglich (Fitzgibbons et al. 2006, O'Dwyer et al. 2006).

2.1.3 Entwicklung und aktuelle Verfahren in der Hernienchirurgie

Mit weltweit ca. 20 Millionen Eingriffen pro Jahr gehören Hernienoperationen heute zu den am meisten durchgeführten Operationen (Costello et al. 2007). Allein in Deutschland werden pro Jahr ca. 200000 Hernien operativ versorgt, wobei sie damit einen Anteil von 10-15 % an den allgemeinchirurgischen Operationen haben (Schumpelick 1997). Seit Beginn der Hernienchirurgie im 19. Jahrhundert entwickelten sich die eingesetzten Techniken kontinuierlich weiter. Stand am Anfang der Hernienchirurgie noch die konventionelle, offene Hernien-OP im Vordergrund, rückten über die Jahre neue Techniken wie der Einsatz von Netzümplantaten oder die laparoskopische Bruchversorgung nach. Heute werden von den über 70 bekannten Operationstechniken international gesehen weniger als 10 standardmäßig durchgeführt. Dazu zählen hierzulande als Hauptverfahren die offene Nahttechnik nach Shouldice, die Netzümplantation nach Lichtenstein und die endoskopisch/laparoskopische Netzümplantation (Bittner und Schwarz 2011). Grund für diesen Paradigmenwechsel sind vor allem die Unterschiede in der Langzeitrezidiv- und -komplikationsrate nach operativer Versorgung, aber auch ökonomische Faktoren, welche immer mehr in den Vordergrund rücken, spielen eine wichtige Rolle. Viele Studien haben gezeigt, dass der Einsatz von Netzümplantaten das erneute Auftreten von Hernien drastisch senken kann. Während für die konventionelle Shouldice-Technik in der Literatur Rezidivraten von 31-54 % angegeben werden (Misra et al. 2006), ließen sich diese durch die spannungsfreie Netz-OP nach Lichtenstein auf deutlich unter 10 % (Welty et al. 2001) und durch die laparoskopische Versorgung auf unter 5 % (Costello et al. 2007) reduzieren. Allerdings hat sich durch den Einsatz von Fremdmaterialien auch die Art der Komplikationen nach OP verändert. Während bei den netzfreien Verfahren vor allem die Rückfallquote im Vordergrund steht, sind mit Einsatz von Implantaten vor allem Empfängerreaktionen wie beispielsweise das Auftreten von Seromen, Adhäsionen, chronische Schmerzen, Fremdkörpergefühl sowie Netzinfectionen (oder das so genannte „stiff abdomen“ nach

Narbenherniotomie) aufgetreten (Forbes et al. 2009, Jin et al. 2009). Die genauen Ursachen und Mechanismen dieser Komplikationen sind bis heute noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung.

Auch der effektive Einsatz von finanziellen Ressourcen spielt bei der Hernienversorgung eine wichtige Rolle. Allein die Operationen von Inguinalhernien verursachten in den USA im Jahr 2005 Kosten in Höhe von mehreren Milliarden US-Dollar (Prieto-Diaz-Chavez et al. 2009). Die unterschiedlichen Operationsverfahren und die dabei möglichen Komplikationen, sowie die hohen Kosten für das Gesundheitssystem, sind Gründe für das große Interesse an der Weiterentwicklung der eingesetzten Materialien.

Seit der Einführung der ersten Netzprothese aus Polypropylen in den 1950ern durch Usher (Usher et al. 1958) ist die Anzahl der Produkte auf dem Markt rasant angestiegen (Orenstein et al. 2011). Aktuell stehen dem Chirurgen mehr als 150 unterschiedliche Herniennetze zur Verfügung, was zeigt, dass das optimale Netz noch nicht gefunden ist (Bittner und Schwarz 2011). Das Problem ist, dass die eingesetzten Netzprothesen je nach chirurgischem Verfahren und Art der Hernie eine Vielzahl unterschiedlicher Voraussetzungen erfüllen müssen (Bringman et al. 2010). Hierzu gehören laut Schmidbauer (Schmidbauer et al. 2005) besonders folgende Eigenschaften:

- keine physikalische Veränderungen durch Gewebeflüssigkeiten
- chemisch inert,
- keine Fremdkörperreaktionen im Empfänger,
- nicht karzinogen,
- kein allergisches Potential,
- mechanisch resistent,
- sterilisierbar.

Des Weiteren sollten die Netze für den Chirurgen leicht handhabbar und für das Gesundheitssystem finanzierbar sein.

Ein weiteres Problem ist die uneinheitliche Klassifikation der verwendeten Netzmaterialien, wobei insbesondere eine Diskrepanz zwischen der verwendeten Terminologie der Netzentwickler und derjenigen der praktischen Chirurgen besteht (Deeken et al. 2011). Die verwendeten Herniennetze lassen sich z. B. nach dem verwendeten Grundmaterial (verschiedene Polymere), der Beschichtung, der Porengröße, dem spezifischen Gewicht, der Anzahl der Fäden und Netzstruktur, oder ihrer Absorbierbarkeit unterteilen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Einteilung aktueller Netzmaterien (Scheidbach et al. 2011)

Bezeichnung/Hersteller	Struktur	Material	Fl.-Gew. (g/m ²)	Po.-größe (mm)	Dicke (mm)
Marlex (Bard)	Monofilament	Polypropylen	95	0,82	0,8 [13]
Optilene (Braun)	Monofilament	Polypropylen	36	1,0	0,39
Prolene (Ethicon)	Duofilament	Polypropylen	85 /108	1,0 – 1,6	0,53 [31]
Surgipro (Autosuture)	Multifilament	Polypropylen	110 [15]	0,68 [16]	0,57
Parietene (Covidien)	Monofilament	Polypropylen	38	1,7	0,4
Parietex (Covidien)	Multifilament	Polyester	129,6	1,0 – 1,7 [17]	k. A.
Mersilene (Ethicon)	Multifilament	Polyester	43,2	0,12	0,23 [18]
Infinet Mesh (Gore)	Monofilamente	ePTFE	„leichtgewichtig, großporig“, keine weitergeh. Angaben		
Dualmesh (Gore)	mikroporös, Folie	ePTFE	k. A.	0,022	½ mm
Dullex (Bard)	mikro- u. makroporös	ePTFE	k. A.	0,8	½ mm
Composix (Bard)	Monofilament + Folie	PP + PTFE	k. A.	k. A.	k. A.
Vypro II (Ethicon)	Multifilament	PP + Polyglactin	35	5,0	0,49 [19]
Proceed (Ethicon)	Monofilament	PP + Cellulose + PDS	44	2,0	0,7 [20]
Dynamesh (Dahlhausen)	Monofilament	PP + PVDF	60 /108	> 1,0	0,7 [20]
Parietene Comp (Covidien)	Monofilament	PP + Collagen	73	1,5 × 1,7	0,7 – 0,9 [20]
Ultrapro (Ethicon)	Monofilament	PP + Polyglecapron	28	3 – 4	0,5 [20]
TiMesh (GfE)	Monofilament	PP + Titan	16 /35	> 1,0	0,2 [19]

Die geläufigste Einteilung ist diejenige in „Lightweight“- und „Heavyweight“-Netze, wobei es sich dabei nicht nur um eine Unterscheidung nach der Dichte bzw. dem spezifischen Gewicht des Netzmaterien handelt. Vielmehr liegt hierbei eine historisch gewachsene Zusammenfassung verschiedener Charakteristika vor, wonach sich beispielsweise ein „Lightweight“-Netz durch ein geringeres Gewicht, aber auch durch größere Poren und eine geringere Oberfläche auszeichnet (Bringman et al. 2010). Eine genauere Unterscheidung wurde kürzlich durch Hollinsky et al. (Hollinsky et al. 2008) vorgestellt. Der Begriff „Lightweight“-Netz ist danach definitionsgemäß einem Netz vorbehalten, das bei einer Größe von 15x10 cm, maximal 0,5 mm dick und 1 g schwer ist. Während die oben genannten makroskopischen Faktoren der Netzimplantate besonders beim Einwachsen ins Gewebe eine wichtige Rolle spielen, sind auch mikroskopische Merkmale wie die chemische Zusammensetzung, die molekulare Geometrie und molekulare Wechselwirkung für die mechanischen und elastischen Eigenschaften der Netze entscheidend (Saberski et al. 2011).

Die drei heutzutage am weitesten verbreiteten Grundmaterialien für Netzprothesen sind die Polymere Polypropylen (PP), Polyester (PE) und (expanded) Polytetrafluorethylen (ePTFE) (Orenstein et al. 2011). Insbesondere PP und PE haben dabei die Hernientherapie über Jahre hinweg dominiert und geprägt (Kapischke et al. 2005). Ursprünglich wurden diese Materialien für die Textilindustrie entwickelt und erst mit der Einführung von Nylon auch in der Medizin eingesetzt (Estour 2005).

Polypropylenetze mit einer Dichte von 70-90 g/m² werden vor allem wegen ihrer sehr guten Biokompatibilität und Zellinteraktion aktuell am häufigsten eingesetzt (Anurov et al. 2008, Chastan 2005). Außerdem gilt PP als sehr festes und chemisch stabiles Polymer (Emans et al. 2009).

Polyester-Prothesen werden seit den 1960er Jahren eingesetzt und zeichnen sich durch ihre starke Hydrophilie, ihre gute Verträglichkeit und ihre Stabilität aus (Estour 2005).

Das neueste Material auf dem Markt ist expanded Polytetrafluorethylen, besser bekannt als Teflon. Auch hier wurde das Material zuerst im Textilbereich als wasserabweisende Schicht in Oberbekleidung und Schuhen (Gore[®]) entwickelt und später für den Einsatz in der Medizin aufgearbeitet. Dieses Polymer ist sehr hydrophob (Estour 2005), zeigt eine etwas schlechtere Biokompatibilität als PP, aber eine sehr hohe Stabilität (Orenstein et al. 2011, Elias 2001). Außerdem wurde für ePTFE ein höheres Schrumpfverhalten der Netze nach Implantation beschrieben (Jacob et al. 2011). Durch die mechanische Stabilität und das geringere Adhäsionspotential wird ePTFE insbesondere bei der intraabdominellen Hernienversorgung verwendet (Conze et al. 2004). Eine Zusammenfassung der biochemischen Hauptcharakteristika der für Herniennetze verwendeten Polymere zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4 Biochemische Charakteristika von Herniennetzen (Estour 2005)

	Multifilament Polyester	Monofilament Polypropylene	ePTFE
Hydrophilicity	++	—	—
Range of pore size:			
I: < 10 microns	—	—	+++
II: > 10 microns and < 1 mm	+++	++	—
III: > 1 mm	+++	++	—
Polarity	Neutral	Neutral	Neutral
Mass/Surface	—	—	+++

2.2. Polymere

2.2.1 Polymere allgemein

Polyester, Polypropylen und Polytetrafluorethylen werden chemisch zu den Polymeren gezählt. Dieser Begriff leitet sich aus dem griechischen Wort „poly“ für „viel“ und dem Begriff „méros“ für „Teil“ ab (Menges et al. 2002). Daraus lässt sich erschließen, dass diese Grundstoffe der Kunststoffe aus vielen gleichen Teilen, so genannten Monomeren, aufgebaut sind, welche miteinander durch kovalente, ionische und/oder Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft werden (Rösler et al. 2006). Ein Makromolekül wird als Polymer bezeichnet, wenn es aus mehr als 1000 Atomen besteht (Bullinger 2007).

Polymere lassen sich nach ihrer Herkunft in anorganisch oder organisch unterteilen. Die organischen Moleküle lassen sich weiter in natürliche makromolekulare Stoffe, abgewandelte Naturstoffe und vollsynthetische Kunststoffe unterscheiden (Feßmann und Orth 2002). Neben dieser Einteilung nach der Entstehung der Polymere lassen sich weitere Klassifikationen, z. B. nach Verwendungszweck (Kautschuke, Halbzeuge, Klebstoffe etc.) oder nach ihrer molekularen Struktur (Thermoplaste, Elastomere, Duroplaste), vornehmen (Schwarzl 1990).

Die natürlichen Polymere kommen in Form von Polysacchariden, Polypeptiden und Polynukleotiden in jedem natürlichen Organismus vor und bilden damit die Grundlage des Lebens (Willibald Pschyrembel 2011). Chemisch modifizierte und synthetisch hergestellte Polymere haben durch ihre vielfältigen Eigenschaften in der Industrie, in Form von Kunststoffen, Fasern, Elastomeren, Überzügen und Adhäsiven, mannigfaltige Verwendung gefunden (Elias 2001).

Die Entwicklung dieser so genannten Kunststoffe begann Anfang des 20. Jahrhunderts, wobei Baekeland im Jahr 1907 erstmals die Herstellung eines vollsynthetischen Kunststoffes namens Bakelit gelang (Schwarzl 1990). Mit Ausbruch der Weltkriege und der damit verbundenen Suche nach günstigen Ersatzrohstoffen wurde die Weiterentwicklung der Polymere massiv vorangetrieben. Die ersten Thermoplaste, also unter Wärme verformbare Kunststoffe wie z. B. Polypropylen, wurden ab Mitte der 50er Jahre aus Nebenprodukten des Heizöls entwickelt (Ehrenstein 1999). Später entstanden dann technische Hochleistungskunststoffe mit höherwertigeren Materialeigenschaften, wie z. B. die Fluorpolymere zu denen auch das PTFE gezählt wird (Bullinger 2007).

Mittlerweile stellen Kunststoffe mit einer Produktion von 18,5 Mio. Tonnen und einem Umsatz von 22,2 Milliarden Euro pro Jahr (Stand 2006) allein in Deutschland auch einen erheblichen Wirtschaftsfaktor dar und sind Teil des täglichen Lebens geworden (Eyerer et al. 2008).

2.2.2 Materialeigenschaften von PE, PP und PTFE

Materialien wie Polyester, Polypropylen und Polytetrafluorethylen werden zu der Gruppe der Thermoplaste gezählt.

Kunststoffe dieser Gruppe bestehen aus Makromolekülen, welche linear oder verzweigt gebunden bei Raumtemperatur fest und unter Hitze reversibel verformbar sind (Ehrenstein 1999). Des Weiteren sind sie in Abhängigkeit ihrer Kristallinität und dem Polymerisationsgrad beliebig oft erweich- und schmelzbar, löslich und weisen im Allgemeinen eine geringe bis mittlere Zugfestigkeit, Steifigkeit und Reißdehnung auf (Eyerer et al. 2008).

Außerdem sind sie beständig gegenüber verdünnten Säuren, Laugen, Alkohol und Estern und verhalten sich geruchlos, geschmacksfrei und weitestgehend physiologisch indifferent (Hellerich et al. 2004). Die anfangs befürchtete Kanzerogenität mit erhöhtem Risiko für Sarkome ausgelöst durch den Oppenheimer-Effekt ließ sich weder für PP- noch für PTFE-Netze nachweisen (Witherspoon et al. 2004).

Polypropylen (siehe Abbildung 2) zählt zu den Standardkunststoffen und ist im Alltag in Form von Plastikbechern, Verpackungen, Kunststoffen in Automobilen sowie diversem Spielzeug allgegenwärtig.

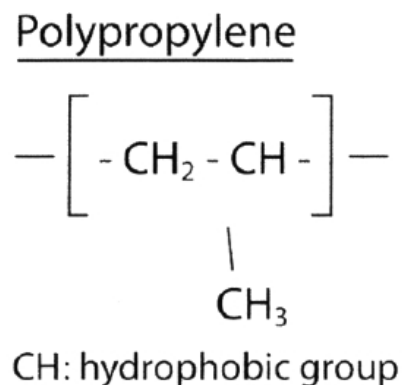


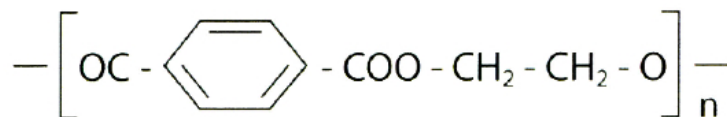
Abbildung 2 Strukturformel Polypropylen (Estour 2005)

Die Produktion gelang erstmals im Jahr 1954 und das Produktionsverfahren für PP und Polyethylen brachte den Forschern G. Natta und K. Ziegler im Jahr 1963 den Nobelpreis für Chemie ein (Kalweit et al. 2012). In der Fertigungstechnik wird PP vor allem wegen seiner weitgehend isotaktischen und teilkristallinen Eigenschaften sowie wegen seiner sehr hohen mechanischen Festigkeit (bei geringem Gewicht), sowie wegen des günstigen Preises gern verwendet (Gerthsen 2008). In der Pharmazie und Lebensmittelbranche ist es wegen seiner guten Haut- und Schleimhautverträglichkeit weit verbreitet.

Die Entwicklung der Polyester begann Ende der 1920er Jahre mit den Grundlagenuntersuchungen des Chemikers W. H. Carothers und es dauerte noch weitere 17 Jahre bis PET (Polyethylenterephthalat), als Rohstoff für synthetische Textilfasern, in Produktion gehen konnte (Kaiser 2007). Heute sind Polyester weit verbreitet und kommen beispielsweise in PET-Flaschen, Textilien, Folien, Werkzeuggehäusen und Platinen zum Einsatz.

Die Strukturformel der Polyester weist mehrfach die Estergruppierung auf (siehe Abbildung 3), wobei PE durch unterschiedliche Verfahren wie Veresterung, Umesterung, Polykondensation, oder Polymerisation hergestellt werden kann (Elsner et al. 2008).

Polyester = Polyethylene terephthalate
(dacron)



COO: hydrophilic group

Abbildung 3 Strukturformel von Polyester (Estour 2005)

Polyester sind in ihren Eigenschaften selbstverlöschend (flammhemmend), zeigen bei Raumtemperatur eine gute Beständigkeit gegenüber Chemikalien und organischen Lösungsmitteln und können durch ihre gute Witterungs- und Strahlungsbeständigkeit auch im Außenbereich angewendet werden (Bottenbruch 1992). Als teilkristalline Thermoplaste hat PE außerdem gute mechanische Qualitäten wie eine hohe Festigkeit, Steifigkeit und sehr hohe

Maßbeständigkeit, besitzt gute Isolations- und Gleiteigenschaften und ist lebensmittelecht (Kalweit et al. 2012).

Die außergewöhnlichen Eigenschaften des Polytetrafluorethylen wie z. B. Hochtemperaturbeständigkeit, Unbrennbarkeit und höchste Chemikalienresistenz sind auf die Polymerisation unter Einwirkung von Fluor zurückzuführen (Kalweit et al. 2012). Es weist zwar in seiner Strukturformel (siehe Abbildung 4) Ähnlichkeiten mit Polyethylen auf, aber unterscheidet sich von diesem vor allem durch seine Chemikalien- und Temperaturresistenz (Erhard 2008).

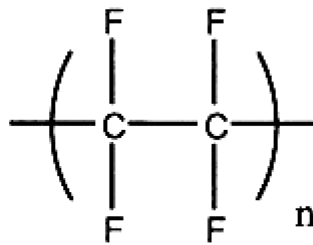


Abbildung 4 Strukturformel PTFE (Harper 2006)

Dies sind unter anderen auch die Hauptgründe für seine weite Verbreitung unter Materialien für höchste Beanspruchungen wie z. B. Laborgeräte oder als wasser- und fettabweisende (Pfannen-) Beschichtung (Grote und Feldhusen 2011, Lautenschläger und Schröter 2007). Außerdem ist PTFE extrem unpolar, ausgeprägt antiadhäsiv (haftfeindlich) und hydrophob, besitzt eine niedrige Festigkeit, Steifigkeit und Härte und ist somit als Spezialkunststoff einzuordnen (Kaiser 2007).

Seit der Entdeckung des PTFE 1938 durch Plunkett ist der Marktanteil der Fluorpolymere trotz des sehr aufwändigen und teuren Produktionsverfahrens stark angestiegen und wie (fast) alle Polymere aus dem Alltag nicht mehr wegzudenken (Keim 2006).

2.2.3 Beschichtungen von Polymeren

Polymere werden heute in vielen Bereichen der Medizin und Medizintechnik eingesetzt. Besonders durch ihre chemische Inertheit (lat. für „untätig, unbeteiligt, träge“), Beständigkeit und physiologische Indifferenz lassen sich diese Stoffe auch als Implantate im menschlichen

Organismus einsetzen. Allerdings bedingen ihre Grundeigenschaften, je nach Material, auch eine Reihe von Nachteilen in der Biokompatibilität.

Diese liegen im Fall von Polypropylen im Vergleich zu anderen Polymeren in höheren Verwachsungsraten mit Darmbestandteilen bei der intraperitonealen Implantation, in der stärkeren Immunantwort des Wirtes und in der Materialschrumpfung bis 50 % nach Implantation (Robinson et al. 2005). Bei PTFE liegen die Nachteile insbesondere in der stärkeren fibrotischen Abkapselung, der schlechteren Anheftung und der damit verbundenen schwächeren Fixierung an das umliegende Gewebe (Voskerician et al. 2007). Bei PE liegen die Mängel vor allem in (relativ) höheren Infektionsraten und dem Verlust von mechanischer Stabilität nach Implantation, wobei vor allem die Infektionen auch auf die bei PE-Netzen verwendete Struktur (multifilament, geflochten) zurückzuführen ist (Robinson et al. 2005).

Insbesondere die Hauptkomplikationen von synthetischen Materialien, wie Inflammation, Infektion, Fibrose und Thrombose, rückten in den letzten Jahren immer mehr in das Interesse der Wissenschaft (Weyhe et al. 2007). Zur Verbesserung der Polymereigenschaften in biologischen Systemen wurden deren makroskopische und mikroskopische Strukturen immer weiter perfektioniert. Das Hauptziel bestand darin, die Entzündungsreaktionen des Wirtes gegenüber dem Fremdmaterial zu reduzieren und die Zelladhäsion an das Implantat zu optimieren (Tamme et al. 2005). Ein Weg, zur Erreichung dieser Ziele liegt in der chemischen und/oder topografischen Oberflächenmodifikation von Polymeren (Lakard et al. 2007).

Für die Zellproliferation auf alloplastischen Materialien scheinen dabei Faktoren wie die spezifische Oberflächenzusammensetzung, -hydrophobie, -topografie, Wasserbindungsfähigkeit, elektrische Ladungen, Materialviskoelastizität sowie Proteininteraktionen eine wichtige Rolle zu spielen (Lakard et al. 2005, Niepel et al. 2009).

Insbesondere die Hydrophobie, welche die Zelladhäsion und -funktion behindern kann, sollte durch Oberflächenmodifikationen wie beispielsweise Beschichtungen, Plasmabehandlungen, oder Ionenbestrahlungen verringert werden (Liu et al. 2009).

Um die Biokompatibilität von Implantaten zu verbessern, wurde über die Jahre eine Reihe von unterschiedlichen Materialien und Beschichtungen in-vitro und in-vivo getestet.

Dabei wurden die verschiedensten natürlichen Materialien, wie z. B. Kollagen, Gelatine und Fibrin sowie künstliche Polymere als Gerüst zum Anzüchten von Gewebe getestet. Doch auch durch Oberflächenmodifikationen wie die Beschichtung mit Matrixproteinen, autologen Zellen

oder diversen Mineralien konnte das optimale Implantatmaterial noch nicht entwickelt werden (Geckeler et al. 2003).

Zu berücksichtigen ist dabei der Umstand, dass insbesondere in der Hernienchirurgie Implantate, abhängig von ihrem Einsatzbereich und dem verwendeten chirurgischen Verfahren, unterschiedliche Anforderungen erfüllen müssen.

Hierbei ist vor allem die Unterscheidung zwischen extraperitonealer und intraperitonealer Implantation wichtig. Der Einbau von Netzmaterialien außerhalb des Peritoneums erfordert ein möglichst schnelles Anwachsen von Zellen, vor allem Fibroblasten, und eine entzündungsfreie Wundheilung ohne Serombildung. Hingegen muss bei der intraperitonealen Implantation das Verwachsen mit dem Intestinum, wegen der Gefahr von Fistel- und Ileusausbildung, vermieden werden (Voskerician et al. 2007). In den hier vorgenommenen Versuchen lag der Hauptschwerpunkt auf einem verbesserten Anwachsverhalten von Fibroblasten auf Netzmaterialien, bestehend aus PP, PE und PTFE.

2.2.4 Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI) ist ein Polymer, welches zu der Gruppe der organisch-synthetischen Polyamine gezählt wird (Niepel et al. 2009). Es wurde erstmals in der Zeit des zweiten Weltkriegs als wasserfestes Harz in Deutschland produziert (Mark 1968). PEI entsteht durch die Polymerisation von Aziridin (Ethylenimin)-Monomeren und kommt in verzweigter oder linearer Form sowie in unterschiedlichen Molmassen (<1000 Da bis 1600 kDa) vor (Prokop 2011). Jedes dritte Atom im PEI ist Stickstoff (siehe Abbildung 5), wobei die Aminogruppen des Moleküls unter Wasserzugabe protoniert werden können und PEI damit in wässriger Lösung als Polykation vorliegt (Horbinski et al. 2001).

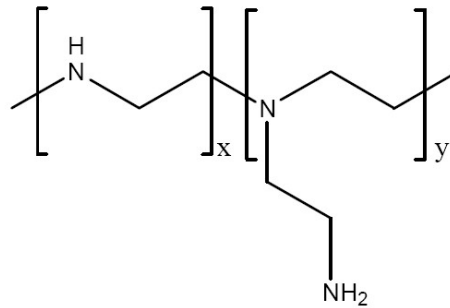


Abbildung 5 Strukturformel Polyethylenimin (Kröhne 2009)

Die elektrostatische Anziehung zwischen den positiv geladenen Aminogruppen des PEI und der negativ geladenen Zelloberfläche könnte eine Ursache für die sehr gute Zelladhäsion und die schnellere Zellreifung sein (Liu et al. 2008, Lelong et al. 1992, Lakard et al. 2004). Auch eine höhere Anhaftung von Adhäsionsproteinen wie z. B. Fibronectin und Vitronectin durch Aminogruppen wird diskutiert (Liu et al. 2009).

Außerdem zeigt PEI eine relativ hohe Luft- und Flüssigkeitspermeabilität, eine hohe thermische Stabilität (z. B. notwendig für Dampfsterilisation), aber auch eine starke Hydrophilie (Altankov et al. 2005). Der Einsatz von PEI als Oberflächenbeschichtung wurde bereits auf einigen Materialien, wie z. B. Glas, Plastik, Verbundstoffen und Siliziumderivaten, erfolgreich getestet (Brunot et al. 2007). In der Industrie wird PEI aktuell hauptsächlich in der Papier-, Holz-, Metall- und Kautschukverarbeitung eingesetzt (Bieleman 2008, Lechner et al. 2010).

Seit der Einführung von Polyethylenimin in die Biomedizin war ein Hauptkritikpunkt die dosisabhängige Zytotoxizität, weshalb es bis heute noch nicht am Menschen eingesetzt wurde (Regnstrom et al. 2006). Aktuell ist die Studienlage widersprüchlich und die Toxizität noch nicht eindeutig geklärt. Einige Studien haben nachgewiesen, dass PEI eine gute Biokompatibilität und eine niedrige Immunogenität hat und nicht bzw. lediglich minimal toxisch ist (Gherghi et al. 2005, Reyes et al. 2004, Altankov et al. 2005, Seifert et al. 2002, Liu et al. 2008).

Für diese Aussagen spricht außerdem, dass PEI in über 30 Zelllinien erfolgreich zur Transfektion verwendet wurde und heute als nicht-viraler in-vitro und in-vivo Gen-Vektor weit verbreitet ist (Horbinski et al. 2001, Choosakoonkriang et al. 2003, Rao et al. 2008).

Allerdings zeigen andere Forschungsergebnisse, dass kationische Polymere durch ihre starke elektrostatische Anziehung auf Zellmembranen allgemein eine hohe Zytotoxizität aufweisen

(Teramura et al. 2008). Außerdem scheint dabei die Hochregulierung von Genen ebenfalls eine Rolle zu spielen (Regnstrom et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Brunot zeigte in einer Studie im Jahr 2007, dass die Toxizität von PEI von dessen Molmasse abhängt (Brunot et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden von den Arbeitsgruppen um Morimoto und Tryoen-Toth publiziert (Morimoto et al. 2003, Tryoen-Toth et al. 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass mit steigender Verzweigung des PEI-Moleküls seine Zelltoxizität und Hämolyseeffekte auf Erythrozyten ansteigen (Prokop 2011). In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein MTT-Zellvitalitätstest zur Überprüfung der Toxizität durchgeführt.

Zusammenfassend stellt sich Polyethylenimin als ein viel versprechendes Polymer dar, dessen Eigenschaften interessante Aspekte für die moderne Medizin darstellen. Insbesondere der Einsatz im Bereich von Prothesen und Implantaten eröffnet eine Vielzahl von Möglichkeiten, die es zu erforschen lohnt.

3 Ziele der Arbeit

Hernienoperationen gehören zu den häufigsten allgemeinchirurgischen Eingriffen. Durch die vielfältigen OP-Techniken und insbesondere durch immer neue Medizinprodukte fällt die Auswahl des optimalen Verfahrens schwer. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Leisten- und Narbenhernienoperationen wird die Verwendung eines Hernienimplantats erforderlich. Hauptzielsetzung der modernen Hernienchirurgie ist die möglichst vollständige Vermeidung eines Rezidivs und eine möglichst optimale Biokompatibilität. Technik und Material müssen in erster Linie Langzeitkomplikationen wie beispielsweise Serome und Schmerzsyndrome vermeiden helfen. Zwar konnten sich bei den Herniennetzen in den letzten Jahren einige Materialeigenschaften wie geringes Gewicht und große Netzporen etablieren, dennoch besteht insbesondere bei den verfügbaren Kunststoffmaterialien noch keine Einigkeit.

Die Materialwissenschaft hingegen erzielte in den letzten Jahren große Fortschritte im Bereich der Kunststoffoptimierung durch unterschiedlichste Beschichtungen. Dadurch gelang es, die bekannten Oberflächen immer weiter zu verbessern und deren Einsatzbereich auszudehnen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Erkenntnisse aus der medizinisch-klinischen Forschung mit der Grundlagenforschung der Materialwissenschaft zu verknüpfen und deren Übertragbarkeit auf das jeweils andere Fach zu überprüfen.

Polyethylenimin hat in den vergangenen Jahren immer wieder gezeigt, dass es eine geeignete Verbindung zur Beschichtung von Kunststoffen ist und die darin enthaltenen Stickstoff-Gruppen gute Angriffsmöglichkeiten für Zellen bieten. Schwerpunkt dieser Arbeit war zum einen die Frage, ob und wie dreidimensionale Netzstrukturen erfolgreich mit PEI beschichtet werden können. Zum anderen sollte geklärt werden, mit welchem Verfahren sich diese Beschichtung auf den Netzen am besten nachweisen lässt. Hierfür wurden 4 unterschiedliche Tests, nämlich der Zellproliferationsnachweis mittels Zellzählung, die Elektronenmikroskopie, die Röntgenphotoelektronenspektroskopie und die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Außerdem wurde mittels MTT-Test die Zytotoxizität des Polyethylenimins untersucht.

Die vorliegende Untersuchung liefert weitere Erkenntnisse im Bereich der Grundlagenforschung von Material- und Zellproliferationseigenschaften von derzeit im Einsatz befindlichen Herniennetzen.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Herniennetze

Zunächst wurde eine Liste gängiger Hernienimplantate zusammengetragen. Innerhalb dieser Liste wurden nach der Art des verwendeten Materials und der Machart der Netze repräsentative, kommerziell erhältliche Implantate ausgesucht. Es erfolgte dann ein Abgleich mit regelmäßig im Rahmen der klinischen Patientenversorgung an der Universitätsklinik Jena zum Einsatz kommenden Netzprothesen. Anschließend wurden für die hier vorliegende Arbeit verschiedene Netzhersteller kontaktiert und gebeten, Netzproben zur Verfügung zu stellen. Als Kriterien für die weitere Verwendung für Zelltests und Beschichtung galt die größtmögliche Vielfalt an Polymeren, sowie eine ausgewogene Mischung unterschiedlicher Hersteller. Die auf dieser Basis untersuchten Netze sind in Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Netzprothesen

PP (Polypropylen)

Index	Größe	Produktname	Hersteller	Eigenschaften lt. Hersteller
1	15x10	ProLite	Atrium	monofil
2	15x7,5	ProLite Ultra	Atrium	monofil, leicht
3	15x10	Premilene	B. Braun	monofil
4	15x10	Optilene LP	B. Braun	monofil, leicht
5	15x10	Optilene Elastic	B. Braun	monofil, leicht, elastisch
6	15x10	Parietene	Covidien	monofil
7	15x10	Parietene	Covidien	monofil, leicht
8	15x10	DynaMesh	Dahlhausen	monofil
9	15x10	DynaMesh light	Dahlhausen	monofil, leicht
10	15x15	Surgipro	Tyco	monofil

ePTFE (expandiertes Polytetrafluorethylen)

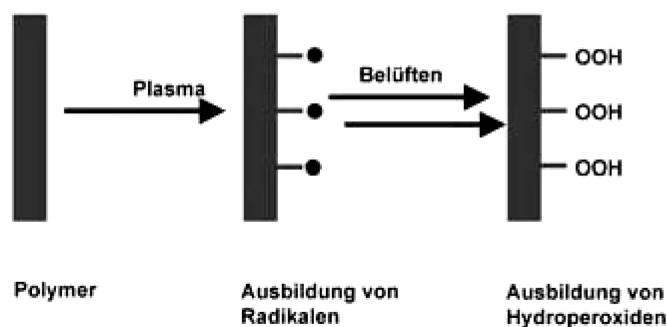
Index	Größe	Produktname	Hersteller	Kommentar
11	5x5	Infinet Mesh	Gore	

PE (Polyester)

Index	Größe	Produktname	Hersteller	Kommentar
12	15x15	Parietex	Covidien	2D-Netz
13	14x10	Parietex	Covidien	2D-Netz mit integriertem Faltmechanismus
14	15x15	Parietex	Covidien	3D-Netz

4.2 Herstellung der Polyethyleniminbeschichtung

Für die Herstellung einer Polyethylenimin-Beschichtung sowie für alle weiteren Tests wurden die sterilen Herniennetze zunächst unter Laborbedingungen in runde und im Durchmesser 1,5 cm große Proben geschnitten. Für die Reinigung und Aktivierung der Oberfläche wurden die Netzteile anschließend für eine Minute einer Sauerstoff-Plasmabehandlung bei 1 mbar unterzogen, wofür ein Harrick Plasma Cleaner (Harrick Scientific Corporation, Ossining, NY, USA) verwendet wurde. Bei diesem Verfahren werden, insbesondere auf Polymeroberflächen mit reaktionsträgen Gruppen wie beispielsweise Polyester oder Polypropylen, mittels Sauerstoffplasma Radikale erzeugt. Wie in Abbildung 6 zu sehen, reagieren diese durch die anschließende Belüftung weiter zu Peroxiden und Hydroperoxiden (Wintermantel und Ha 2008). Hierdurch erfährt die vormals hydrophobe Oberfläche eine Aktivierung und lässt sich danach besser benetzen, was sich auch in einem kleineren Kontaktwinkel äußert (Kerspe 2000, Yang et al. 2009).



**Abbildung 6 Schematische Darstellung einer Sauerstoffplasmabehandlung
(modifiziert nach Wintermantel und Ha 2008)**

Anschließend wurde die 5 mg/ml wässrige PEI-Lösung hergestellt. Hierfür wurde Poly(ethylenimine) (M_w 750000, P3143, Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) verwendet. Die zu behandelnden Netzproben wurden für 20 Minuten in die PEI-Lösung und danach für weitere 4 Minuten in H_2O gelegt. Danach wurden die Proben kurz in 99 %iges Ethanol (HPLC grade ethanol, VWR International, Dresden, Germany) getaucht und luftgetrocknet.

4.3 Auswertungsmethoden

4.3.1 Elektronenmikroskopie

Für die mikroskopische Analyse der unbehandelten Netze sowie die Auswirkung der Plasmabehandlung auf die Struktur der Netzoberfläche wurde die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Außerdem sollte hiermit der optische Nachweis der Zelladhäsion auf den Proben erfolgen. Die Zellproben wurden zuerst mit 2,5 %igen Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) in PBS (pH 7,4, VWR International, Dresden, Germany) für 1 Stunde bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit einer ansteigenden Wasser-Alkohollösung von 25, 50, 75, 95 und 100 % Ethanol (HPLC grade ethanol, VWR International, Dresden, Germany) dehydriert. Diese Lösung wurde pro Konzentration 10 Mal ausgetauscht und die Proben vor der Goldstaubbeschichtung luftgetrocknet. Die Elektronenmikroskopie wurde mittels eines LEO 440i SEM Scanning Electron Microscope (LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Germany) bei 15 kV durchgeführt. Um die elektrostatische Aufladung der Netze zu minimieren, wurden die Netzproben mit Gold beschichtet (ca. 10 nm).

4.3.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Für die Analyse der chemischen Zusammensetzung der Beschichtung, wurde das Verfahren der Photoelektronenspektroskopie (englisch X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) verwendet. Das XPS-Verfahren beruht auf dem Photoeffekt und wurde maßgeblich von der Arbeitsgruppe um K. Siegbahn in den 1950er Jahren entwickelt, wofür dieser später den Nobelpreis erhielt (Krieger 2009, Ardenne 2005). Bei der Röntgenphotoelektronenspektroskopie werden aus Atomen, Molekülen oder Festkörpern durch elektromagnetische Strahlung Photoelektronen herausgelöst. Diese Elektronen werden durch Photonenbeschuss aus den Proben herausgelöst. Dann wird deren Bindungsenergie in einem Analysator gemessen und als Spektrum aufgetragen. Die Abbildung 7 zeigt die für die Röntgenphotoelektronenspektroskopie nötigen Basiskomponenten. Die Informationstiefe des XPS-Verfahrens beträgt je nach Material und verwendetem Energiebereich 0,5 bis 10 nm (Kurzweil und Scheipers 2012, Förch et al. 2009).

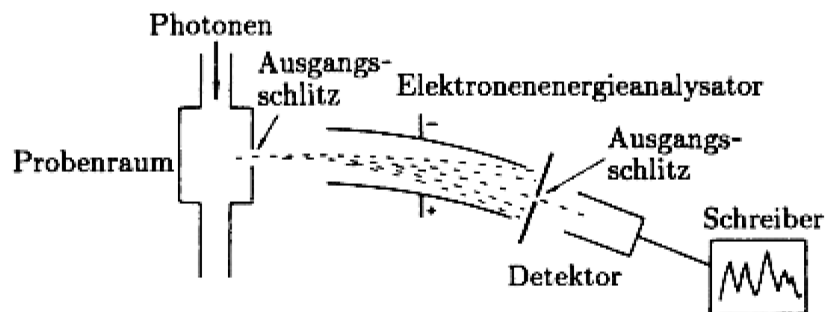


Abbildung 7 Basiskomponenten eines XPS Systems (Hollas et al. 2000)

Zuerst wurde aus einer Al K_{α} Röntgenquelle (1487 eV) ein Röntgenstrahl erzeugt. Dieser traf die Oberfläche des zu untersuchenden Materials in einem vorher festgelegten Winkel von 45° . Die dabei emittierten Elektronen wurden in einem Analysator registriert und wiesen eine bestimmte kinetische Energie auf. Daraus ließ sich die für das Atom spezifische Bindungsenergie E_B bestimmen (Ardenne 2005). Das hierfür verwendete Gerät (Quantum 2000, PHI co., Chanhassen, MN, USA) wies ein Bindungsenergiespektrum von 0-1400 eV mit einer Passenergie von 117,4 eV auf. Der Energiemodus war über alle Messungen konstant.

Die Datenanalyse erfolgte mit der Herstellersoftware. Als Referenzwert für die Bindungsenergieskala wurde der Kohlenwasserstoff Spitzenwert des C1s Spektrums auf

284,8 eV gesetzt. Von jedem Material wurden jeweils 3 unbeschichtete und 3 beschichtete Proben untersucht und die Spektren von C1s, N1s, O1s, Si2p und P2p an jeweils zwei unterschiedlichen Punkten gemessen.

4.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (engl. confocal laser scanning microscopy, CLSM) wurde zum Nachweis der PEI-Beschichtung eingesetzt. Die Bilder dieses Verfahrens zeichnen sich dabei durch besonders hohe optische Auflösung sowie starke Kontraste aus und eignen sich insbesondere bei der Untersuchung sehr dicker Präparate (Welsch 2010). Die Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Confocal Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta, Germany) und einem Argon Laserstrahl bei einer Wellenlänge λ von 488 nm im Reflexionsmodus durchgeführt. Der Laser scannte dabei die Bildebene seitlich und erzeugte Bilder bestehend aus N^2 Pixeln wobei für alle Messungen $N=512$ gewählt wurde. Weiterhin wurde ein Achroplan 100x/0,8 W Linsenobjektiv (Carl Zeiss) verwendet. Die CLSM-Daten wurden mit Hilfe der Herstellersoftware digitalisiert und zu einem räumlichen Modell rekonstruiert.

Die mit PEI beschichteten Netzproben wurden vor der Behandlung mit Carboxy-Fluorescein (Carboxy-FITC, Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) umlaufend halbseitig mit Klebestreifen abgedeckt. Die nicht abgedeckten Bereiche wurden mit Fluoreszenz-Farbstoff gefärbt. Dazu wurden 1mg Carboxy-FITC in 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO, VWR International, Dresden, Germany) gelöst, mit 10 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) verdünnt und die Proben für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in diese Lösung gelegt. Anschließend wurden die Proben mit 2-fach deionisiertem Wasser (Millipor-Wasser, Widerstand 25 MOhm cm) abgespült und im Luftstrom getrocknet. Die Klebestreifen wurden vor der CLSM-Analyse entfernt.

4.3.4 Zellproliferationstests

Als Zellkultur wurden gefrorene Mausfibroblasten (3T3 Swiss Albino Mouse, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSZM, Braunschweig, Germany) verwendet und in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, VWR International, Dresden, Germany), bestehend aus 10 % fetalem Rinderserum (VWR International, Dresden, Germany) bei 37 °C feuchter Atmosphäre und 5 % CO₂ angezüchtet. Danach wurden die Zellen durch Trypsinierung entfernt und in DMEM gewaschen. Das Nährmedium wurde verworfen und die Kulturen auf den

Proben mit einer Dichte von 10000 Zellen/cm² bei 37 °C und einer 5 % CO₂-haltigen, feuchten Atmosphäre für 2 und 24 Stunden inkubiert. Um den Auftrieb der Proben zu überwinden und sie komplett in der Lösung zu halten, wurden sie mit sterilen chirurgischen Stapler-Klammern aus rostfreiem Edelstahl (Royal 35W, Covidien, Germany) beschwert. Dafür waren, ähnlich der Arbeit von Weyhe et al., pro Probe 2 Klammern nötig (Weyhe et al. 2007).

Nach der Inkubationszeit wurde das zellkulturhaltige Medium entfernt und die Netzproben vorsichtig mit 1 mM phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,4, VWR International, Dresden, Germany) gewaschen. Dadurch wurden die nicht sicher haftenden Zellen von den Proben abgelöst. Für die CLSM- und REM-Analyse wurden die Zellen für eine Stunde bei 4 °C mit 2,5 %igem Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) in PBS fixiert. Daraufhin wurden die Proben gewaschen und in PBS für die weitere Verwendung aufbewahrt.

Für die Zellzählung wurden die Proben nach der 2- und 24-stündigen Inkubation zwei Mal vorsichtig mit PBS gewaschen, um die nicht adhärenen Zellen zu lösen. Anschließend erfolgte die Trypsinierung mit 0,25 %igen Trypsin (VWR International, Dresden, Germany) in PBS und die Zellzählung mittels Z1 Coulter counter (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany).

4.3.5 Zytotoxizitätstest

Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) (MTT, Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) überprüft. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden zu jeder Probe 100 µl des MTT (5 mg/ml) hinzugefügt und für weitere 4 Stunden bei 37 °C bebrütet. Dabei wandeln die Mitochondrien in den lebenden Zellen durch ihre Succinat-Dehydrogenase das gelbe Tetrazoliumderivat in ein dunkelblaues Formazansalz um. Die Konzentration des Formazanproduktes verhält sich dabei proportional zur Zellaktivität und Zellzahl (Wintermantel und Ha 2002).

Danach wurden die Proben in 0,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, VWR International, Dresden, Germany) gelöst und auf Mikropplatten aufgebracht. Anschließend wurde die Absorption der Formazankonzentration bei 570 nm mittels eines Power Wave XS Mikropplatten Spektrophotometers (Bio-Trek Co., Winooski, VT USA) gemessen.

4.3.6 Statistische Analyse

Die deskriptive Statistik erfolgte anhand von Mittelwerten und Standardabweichungen.

Für die Auswertung des N1s-Spektrums im XPS-Verfahren wurde für jedes Material ein T-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt, welcher die unbeschichteten mit den PEI-beschichteten Proben verglich.

Für die statistische Auswertung der Zellproliferation wurde zuerst ein Globaltest durchgeführt, um mögliche Wechselwirkungen zwischen Material, Beschichtung und Messzeit genauer zu untersuchen. Für diesen Globaltest und die darauf folgende Einzelauswertung der Materialien wurde eine ANOVA durchgeführt. Zur Auswertung der Toxizität wurden die Materialien in Gruppen zusammengefasst und mittels Levene-Test auf Gleichheit der Varianzen untersucht. Anschließend erfolgte ein entsprechender T-Test bei unabhängigen Stichproben zur Bestimmung der Toxizität.

Das Signifikanzniveau wurde für alle hier durchgeführten Tests auf 5 % gesetzt.

Die gesamte statistische Analyse in dieser Arbeit wurde mit der Statistik Software SPSS Statistics (Version 19, IBM Company, USA) vorgenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Elektronenmikroskopische Bewertung der Herniennetze

Die elektronenmikroskopische Analyse der Netzproben vor und nach der Beschichtung sollte die strukturellen Auswirkungen der Plasmabehandlung auf das Material erfassen. Hierfür wurden Aufnahmen in 15-facher und 500-facher Vergrößerung vorgenommen. Die Abbildungen 8 bis 11 zeigen exemplarisch die Aufnahmen vor und nach der Behandlung. Auf allen Bildern zeigen sich bei starken Vergrößerungen mikroskopische Ablagerungen und eine etwas sprödere Oberfläche. Insbesondere beim Gore Netz scheint die Toluolbehandlung (Abb. 10d) die Materialoberfläche aufzurauen. Außerdem zeigten sich nach der Plasmabehandlung des Premilene Netzes vermehrte Ablagerungen auf den Netzfäden (Abb. 8f).

Größere Auffaserungen oder gar die Zerstörung der Netzfäden durch die hier verwendeten Verfahren ließen sich aber bei keiner Probe nachweisen.

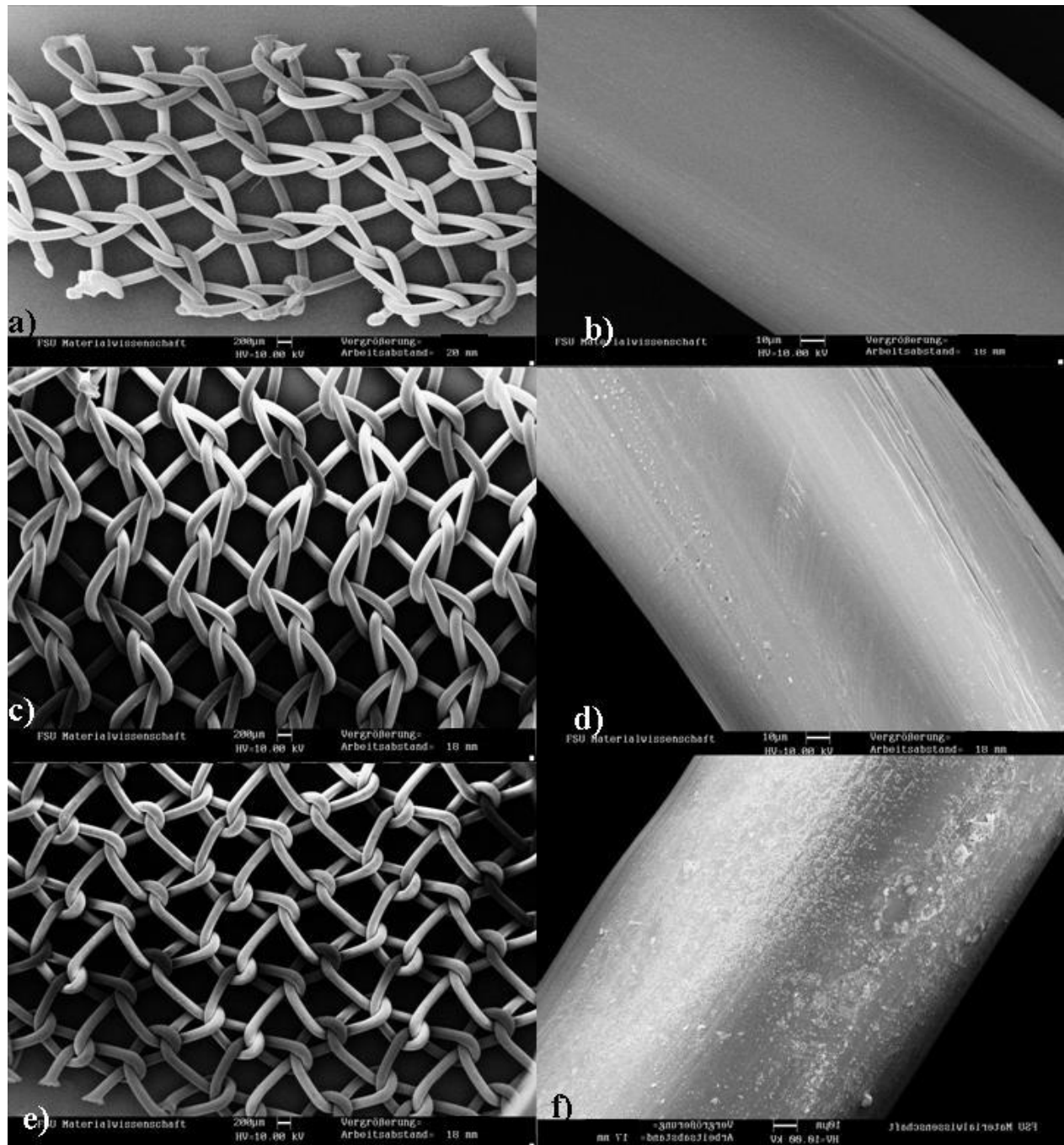


Abbildung 8 REM (Rasterelektronenmikroskopie) Premilene

a) unbehandelt 15-fache Vergrößerung, b) unbehandelt 500-fache Vergrößerung, c) nach Toluolbehandlung 15-fache Vergrößerung, d) nach Toluolbehandlung 500-fache Vergrößerung, e) nach Plasmabehandlung 15-fache Vergrößerung, f) nach Plasmabehandlung 500-fache Vergrößerung

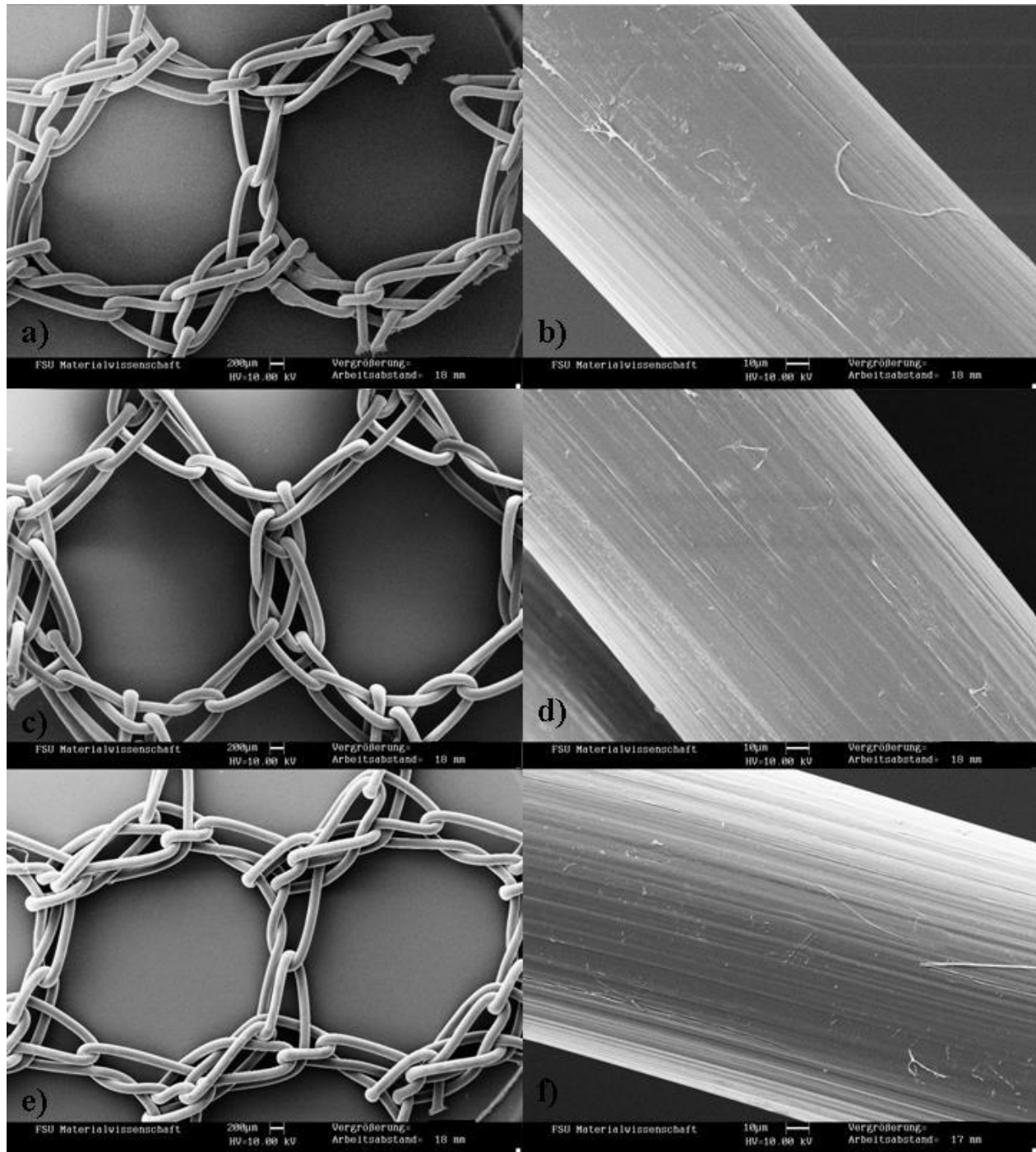


Abbildung 9 REM Optilene Elastic

a) unbehandelt 15-fache Vergrößerung, b) unbehandelt 500-fache Vergrößerung, c) nach Toluolbehandlung 15-fache Vergrößerung, d) nach Toluolbehandlung 500-fache Vergrößerung, e) nach Plasmabehandlung 15-fache Vergrößerung, f) nach Plasmabehandlung 500-fache Vergrößerung

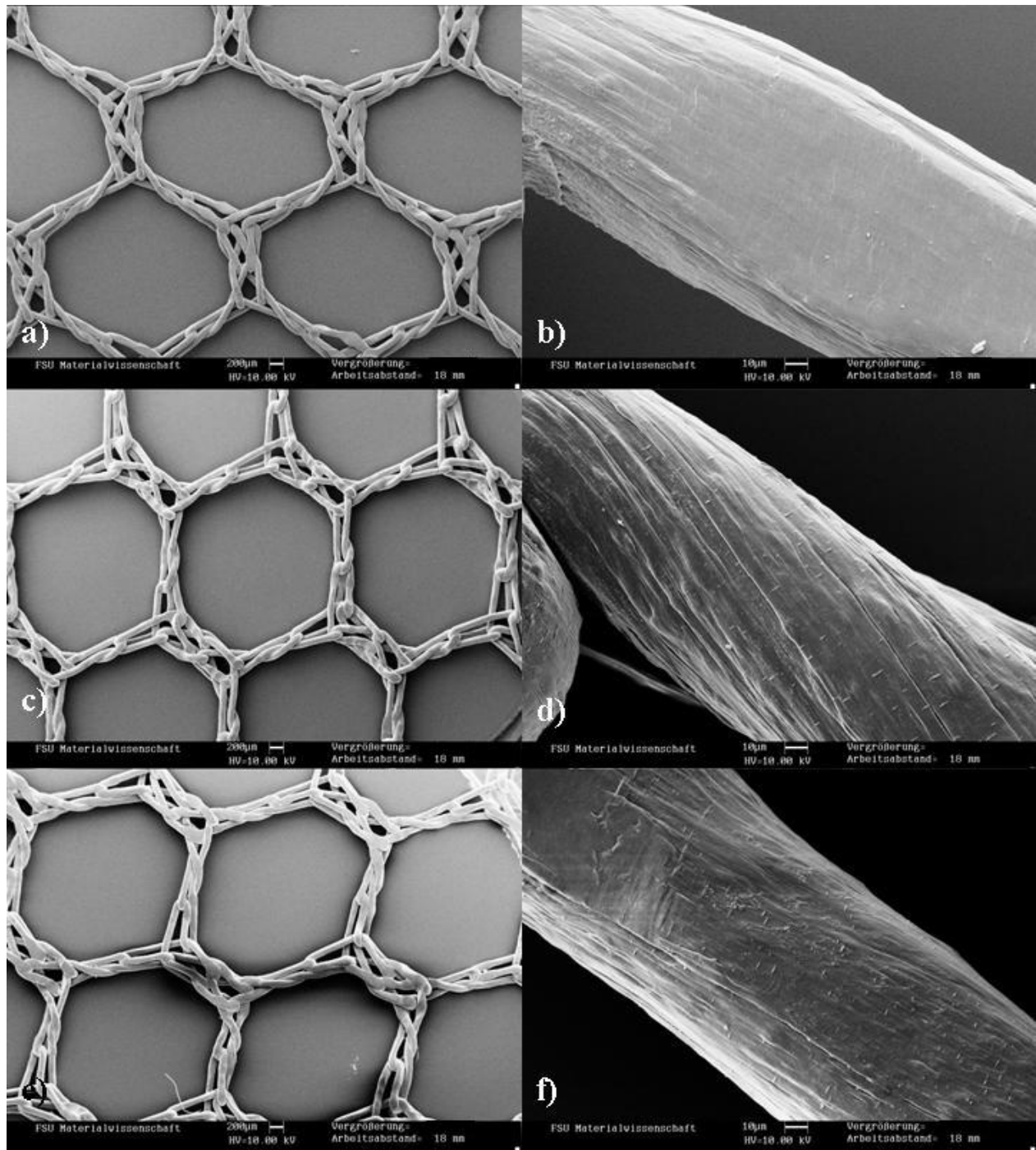


Abbildung 10 REM Infinit Mesh

a) unbehandelt 15-fache Vergrößerung, b) unbehandelt 500-fache Vergrößerung, c) nach Toluolbehandlung 15-fache Vergrößerung, d) nach Toluolbehandlung 500-fache Vergrößerung, e) nach Plasmabehandlung 15-fache Vergrößerung, f) nach Plasmabehandlung 500-fache Vergrößerung

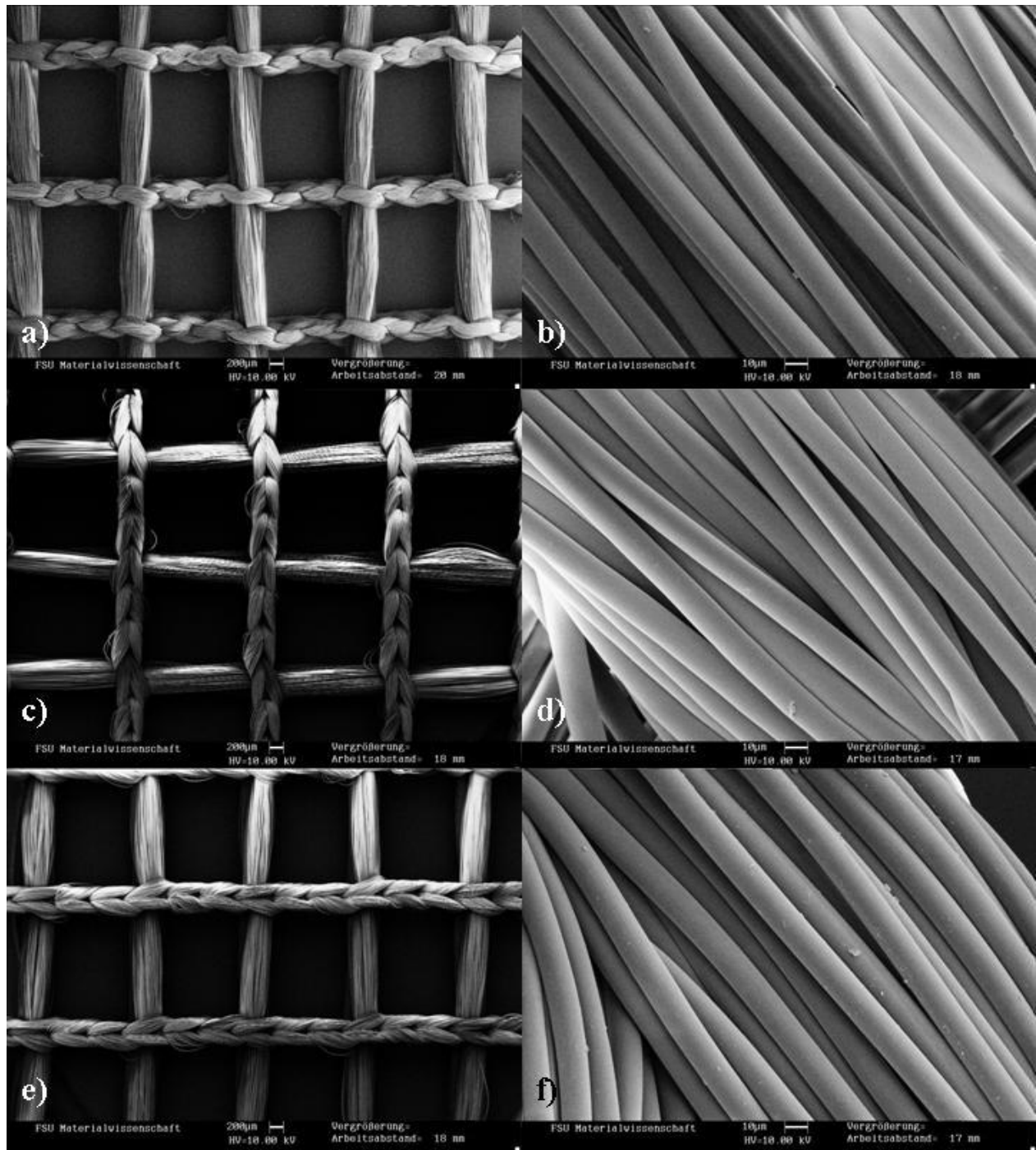


Abbildung 11 REM Parietex

a) unbehandelt 15-fache Vergrößerung, b) unbehandelt 500-fache Vergrößerung, c) nach Toluolbehandlung 15-fache Vergrößerung, d) nach Toluolbehandlung 500-fache Vergrößerung, e) nach Plasmabehandlung 15-fache Vergrößerung, f) nach Plasmabehandlung 500-fache Vergrößerung

5.2 Nachweis der PEI-Beschichtung mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Als Nachweis für eine erfolgreiche PEI-Beschichtung wurde das XPS-Spektrum von jeweils 3 Netzproben vor und nach der Beschichtung untersucht. Die erfolgreiche Beschichtung mit Polyethylenimin zeigt sich in einem Anstieg des Stickstoffpeaks N1s (Sun et al. 2011, Briggs 1998), weshalb nur dieses statistisch ausgewertet wurde. Bei allen 12 beschichteten Proben zeigte sich ein Anstieg der N1s-Konzentration. Nach statistischer Auswertung war dieser N1s-Anstieg aber nur bei dem Premilene Netz (PP) von B. Braun ($p < 0,005$) und dem Parietex-Netz (PE) von Covidien ($p < 0,001$) (siehe Abb. 13 und 16) statistisch signifikant.

Die Tabellen 6 bis 9 zeigen die T-Tests vor und nach der Beschichtung inklusive der Signifikanzen, des Standardfehlers und der mittleren Differenz der N1s-Konzentration. Die mittlere Differenz stellt dabei den quantitativen Unterschied zwischen beschichteter und unbeschichteter Probe dar. Die zugehörigen Profildigramme 13 bis 16 veranschaulichen den Anstieg des Stickstoffspektrums, wobei der Stern * eine signifikante Zunahme kennzeichnet. Die Abbildung 12 zeigt beispielhaft den Auszug des XPS-Spektrums einer beschichteten Parietex-Netzprobe, wobei der signifikante N1s-Peak bei 397-400 eV sichtbar ist. Dies ist als erfolgreiche PEI-Beschichtung zu werten.

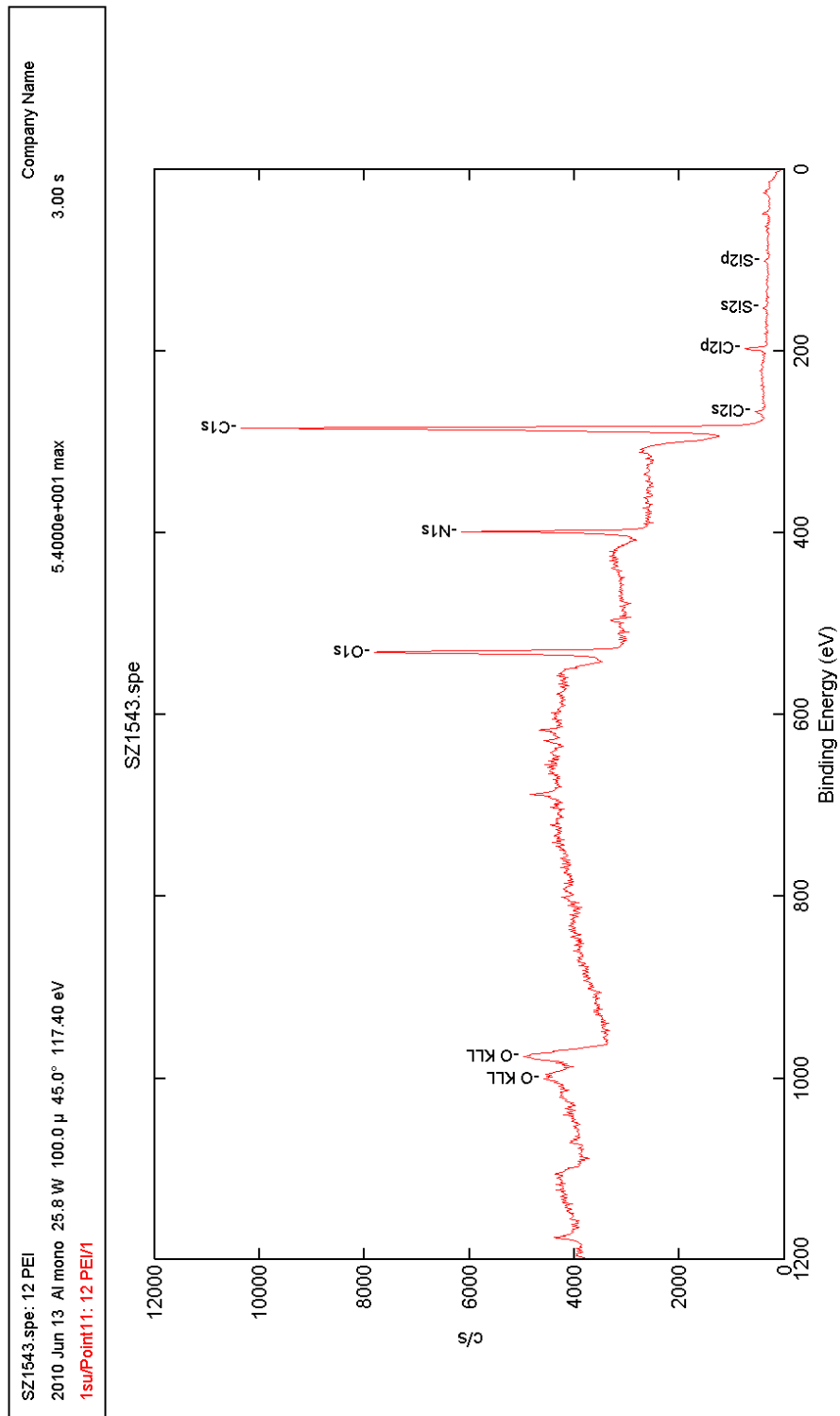


Abbildung 12 Röntgenphotoelektronenspektroskopie für Parietex-Netz mit PEI-Beschichtung

Die Abbildung zeigt einen signifikanten Anstieg der N1s-Orbitale, welcher als Nachweis für eine erfolgreiche PEI-Beschichtung zu werten ist

Tabelle 6 T-Test bei unabhängigen Stichproben für XPS Premilene

Material	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
Premilene	unbeschichtet	PEI	-1,937*	,328	,004

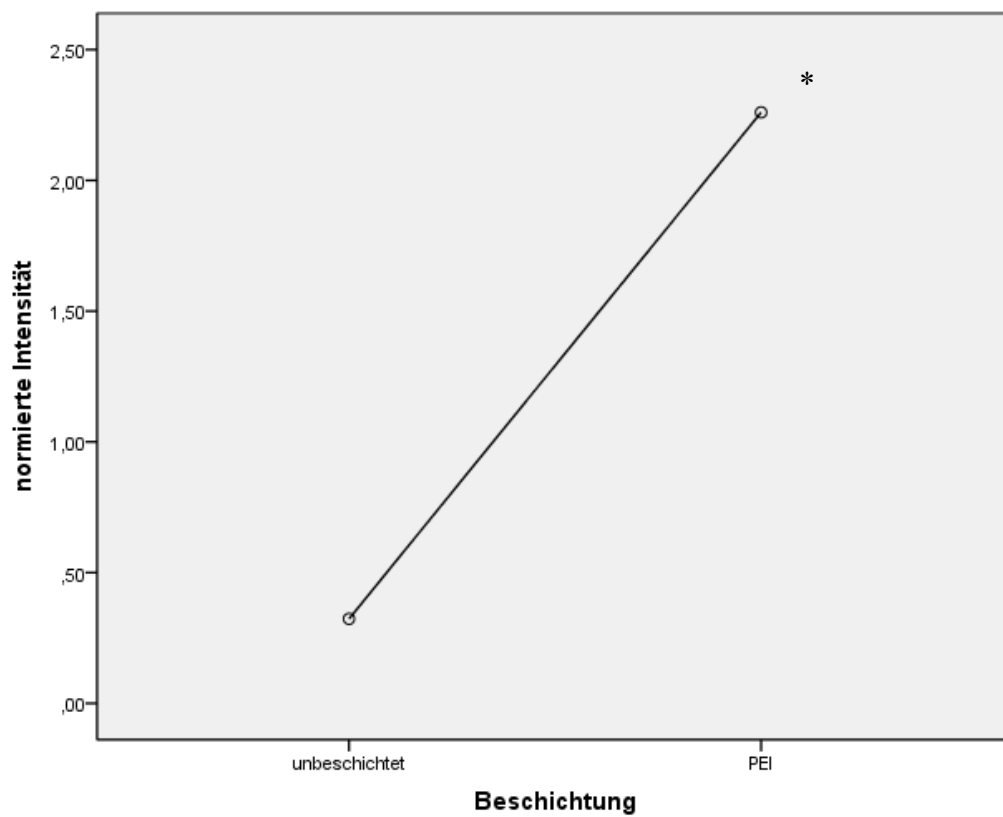
**Abbildung 13 Profildiagramm XPS (N1s) Premilene**

Tabelle 7 T-Test bei unabhängigen Stichproben für XPS Optilene Elastic

Material	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
Optilene	unbeschichtet	PEI	-,543	,373	,219

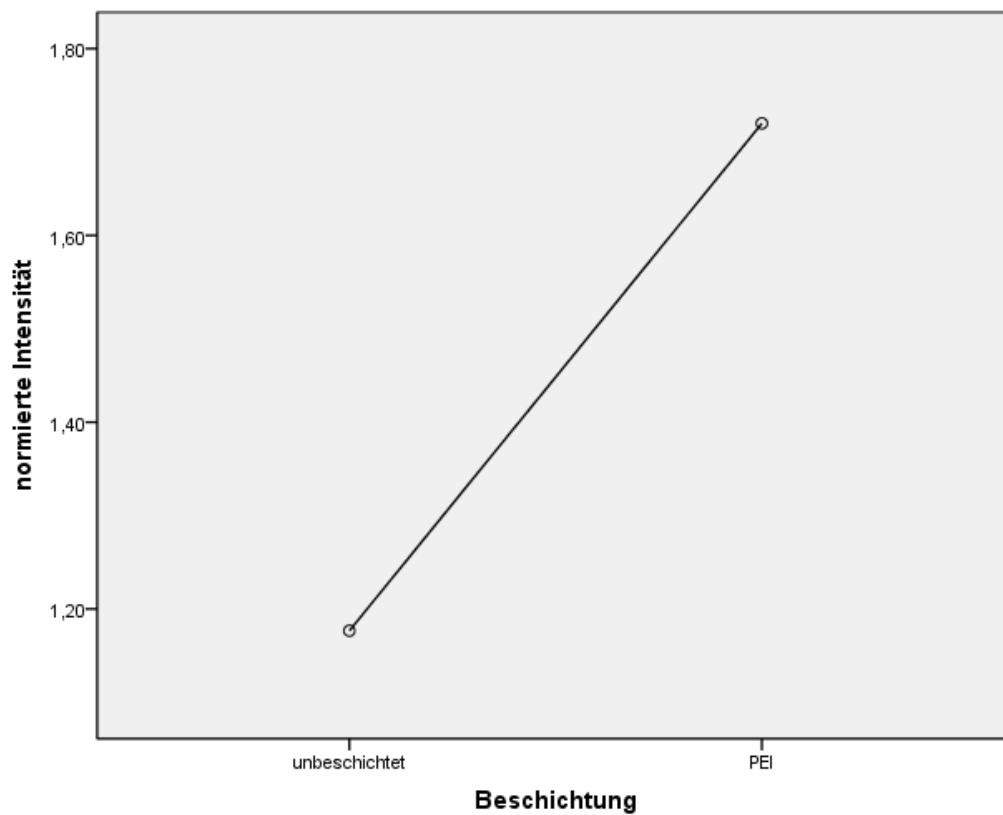
**Abbildung 14 Profildiagramm XPS (N1s) Optilene Elastic**

Tabelle 8 T-Test bei unabhängigen Stichproben für XPS Infinet Mesh

Material	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
Gore	unbeschichtet	PEI	-,110	,807	,898

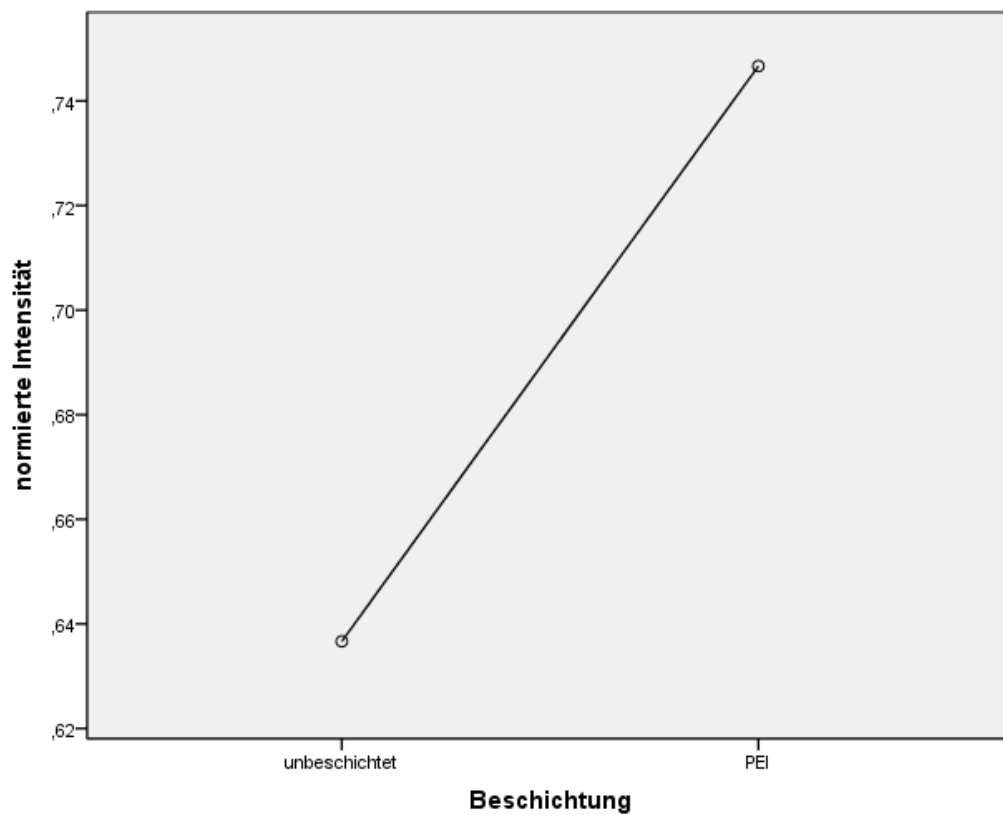
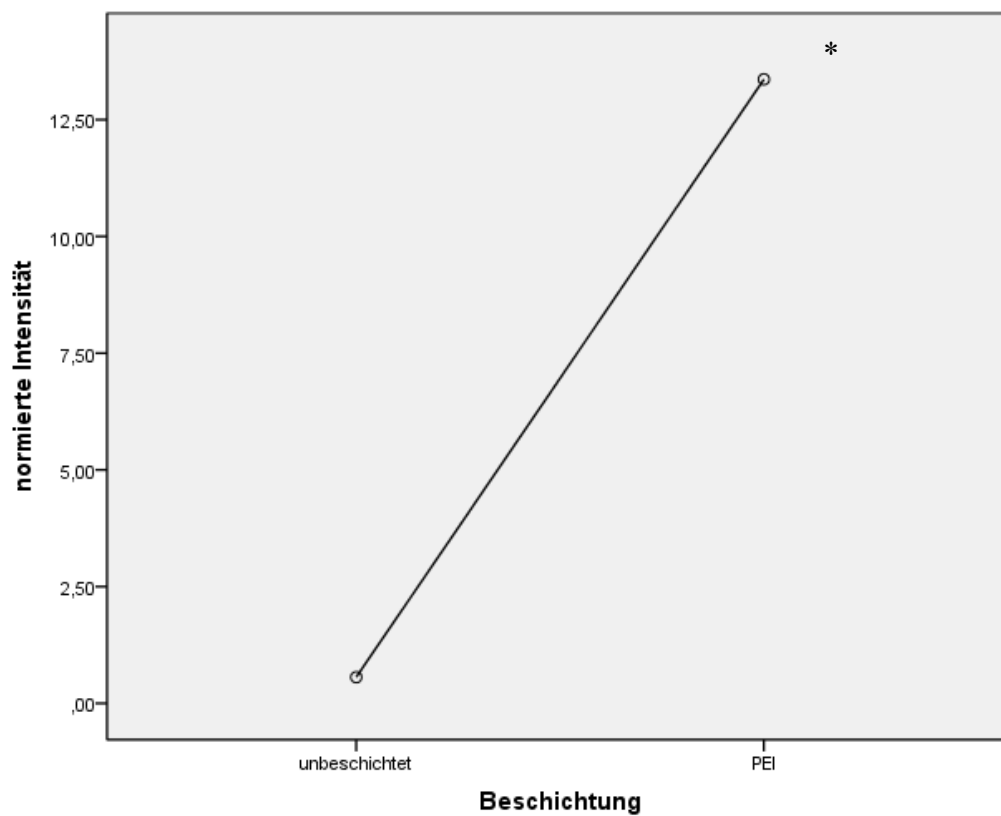
**Abbildung 15 Profildiagramm XPS (N1s) Infinet Mesh**

Tabelle 9 T-Test bei unabhängigen Stichproben für XPS Parietex

Material	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
Parietex	unbeschichtet	PEI	-12,803*	1,214	,000

**Abbildung 16 Profildigramm XPS (N1s) Parietex**

5.3 Nachweis der PEI-Beschichtung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Dieses Verfahren weist durch fluoreszenzmarkiertes Carboxy-FITC die PEI-Beschichtung optisch nach. Bei einer erfolgreichen Beschichtung ist eine im Vergleich zur unbeschichteten Seite stärkere Signalintensität zu verzeichnen.

Die Abbildungen 17 bis 20 zeigen die Netzproben, wobei der eingelegte Pfeil in Richtung der Seite mit PEI-Beschichtung verläuft. Das unten angefügte Diagramm stellt die Signalintensität im Verlauf der Pfeilrichtung dar. Mit Hilfe dieses Verfahrens ließ sich bei keiner Netzprobe eine eindeutige PEI-Beschichtung nachweisen. Dies zeigt sich auf den Bildern dadurch, dass sich die fluoreszenzmarkierten Areale ungleichmäßig über das gesamte Netz verteilen und eine optisch klare Trennung zwischen beschichteter und unbeschichteter Seite nicht möglich ist.

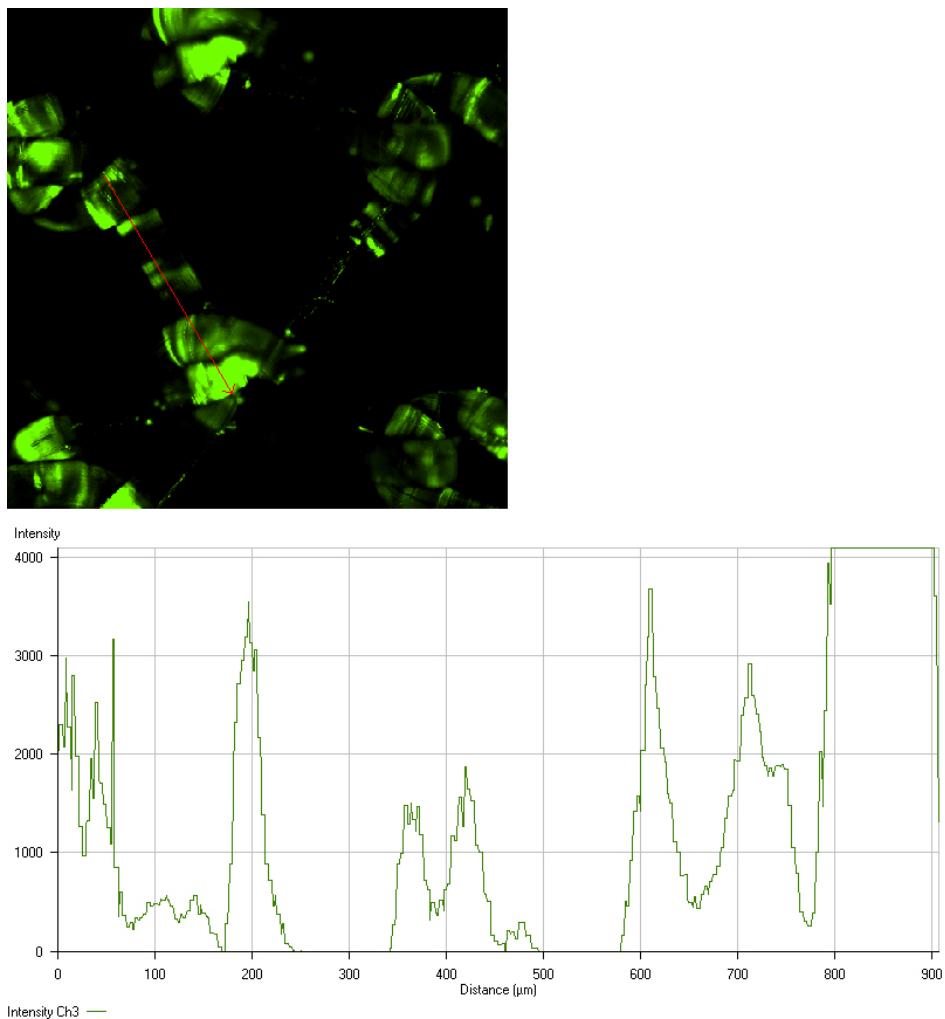


Abbildung 17 CLSM Premilene (PP) nach Carboxy-FITC Beschichtung

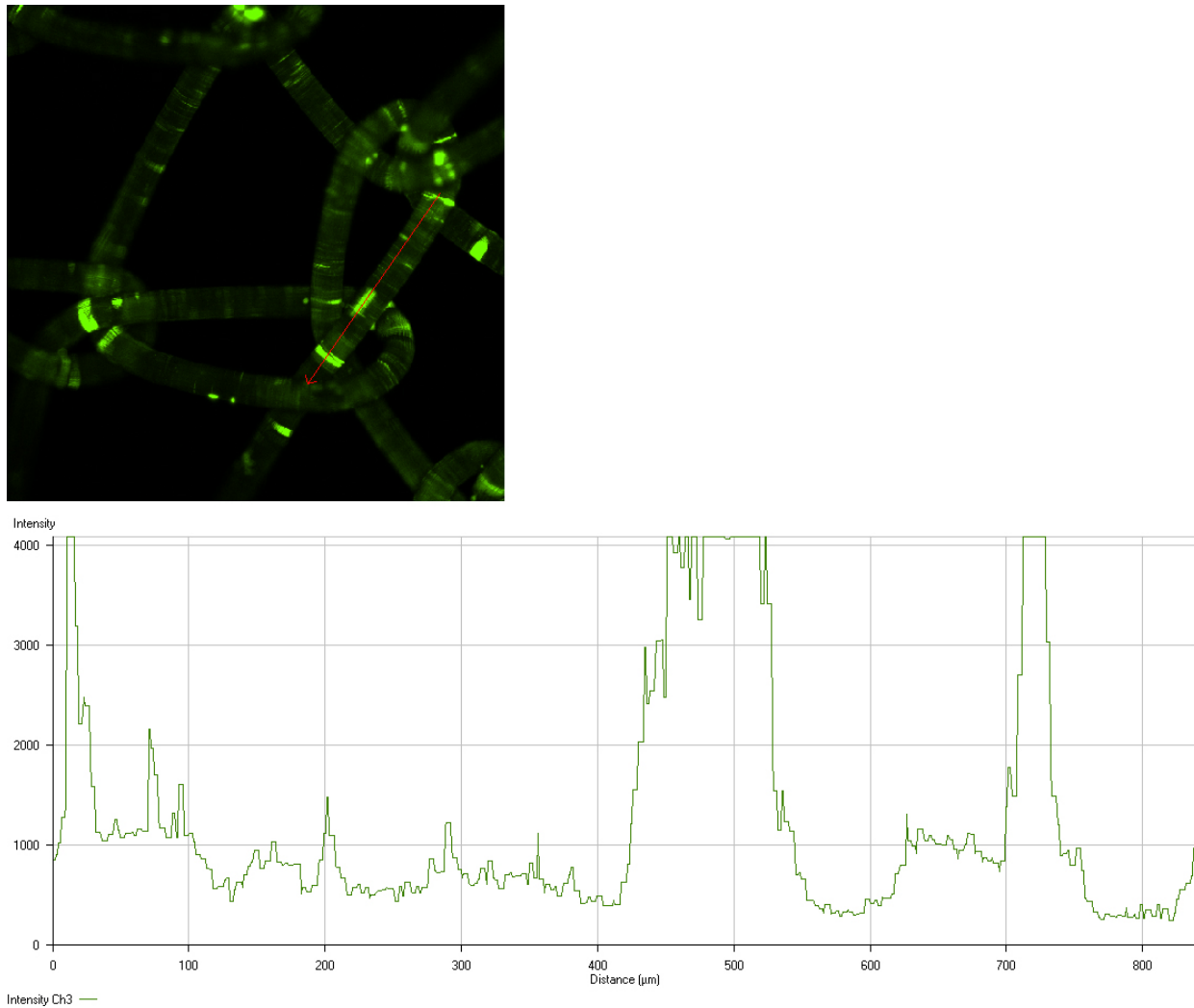


Abbildung 18 CLSM Optilene Elastic (PP) nach Carboxy-FITC Beschichtung

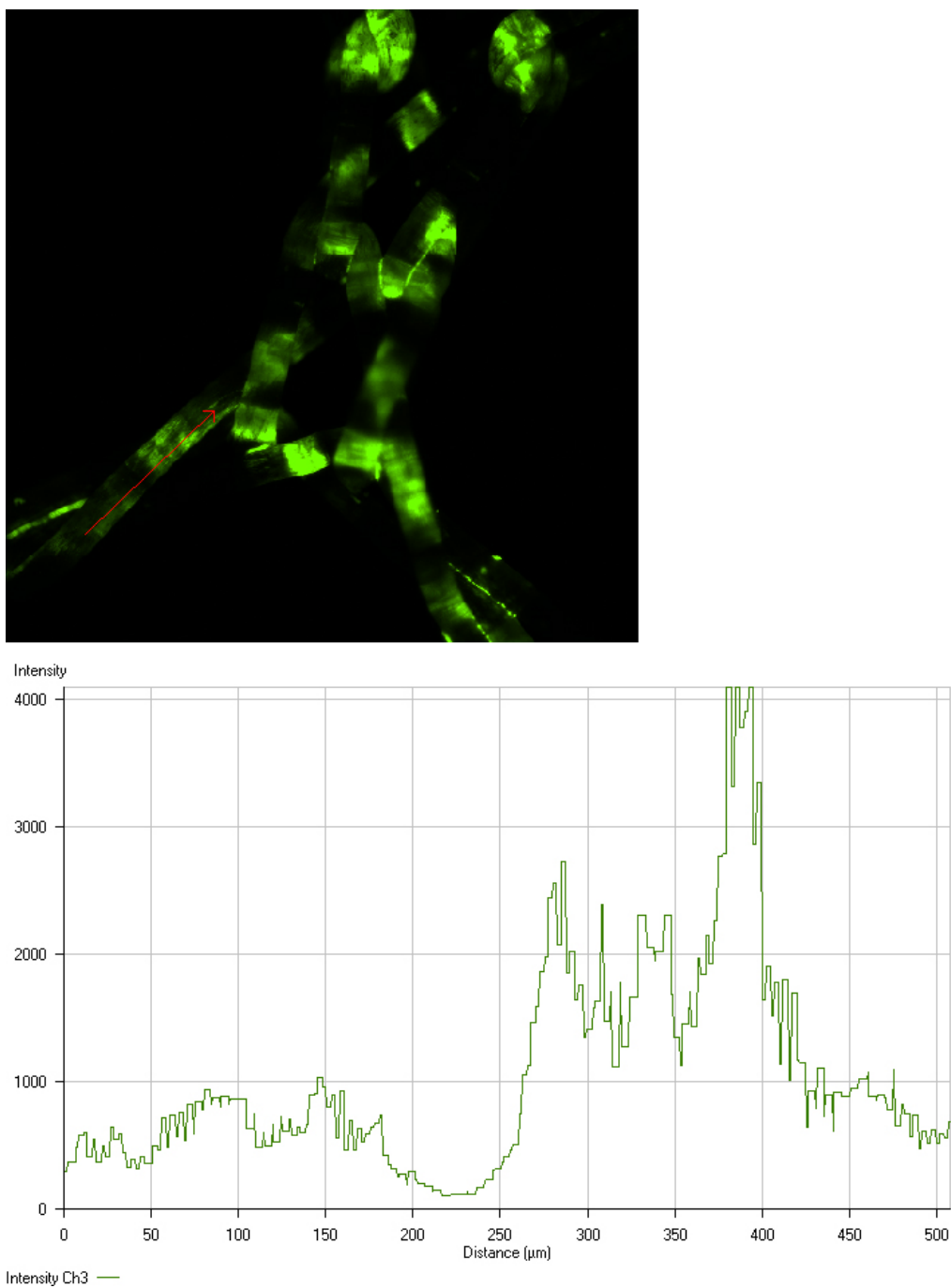


Abbildung 19 CLSM Infinit Mesh (ePTFE) nach Carboxy-FITC Beschichtung

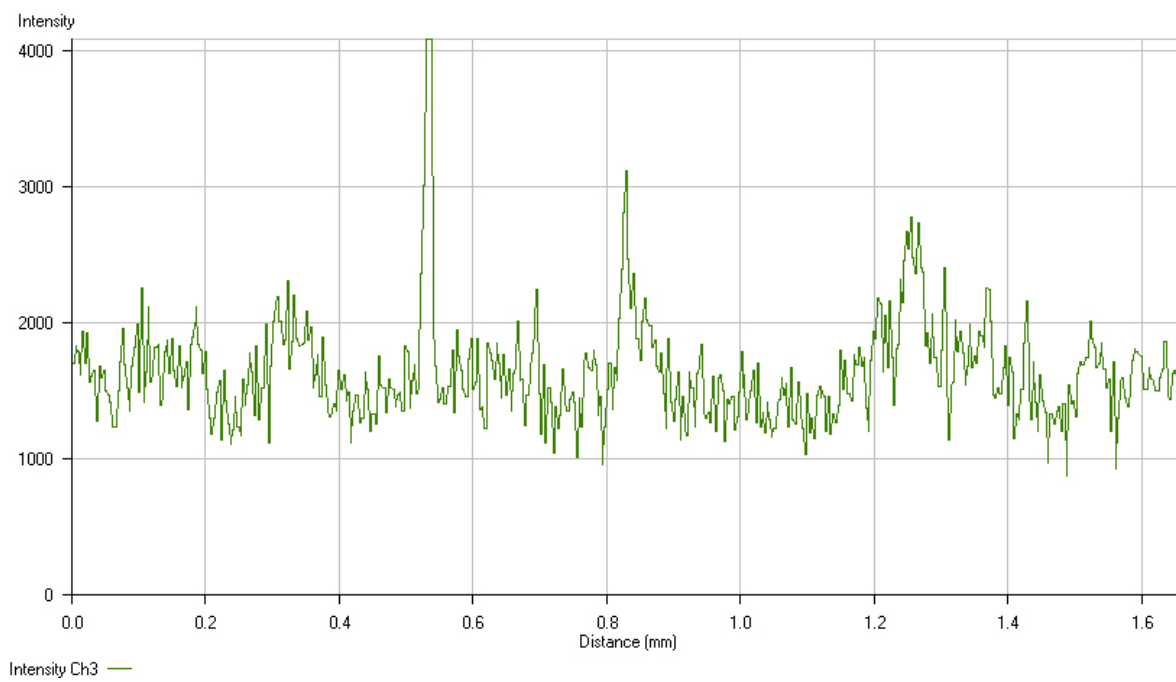
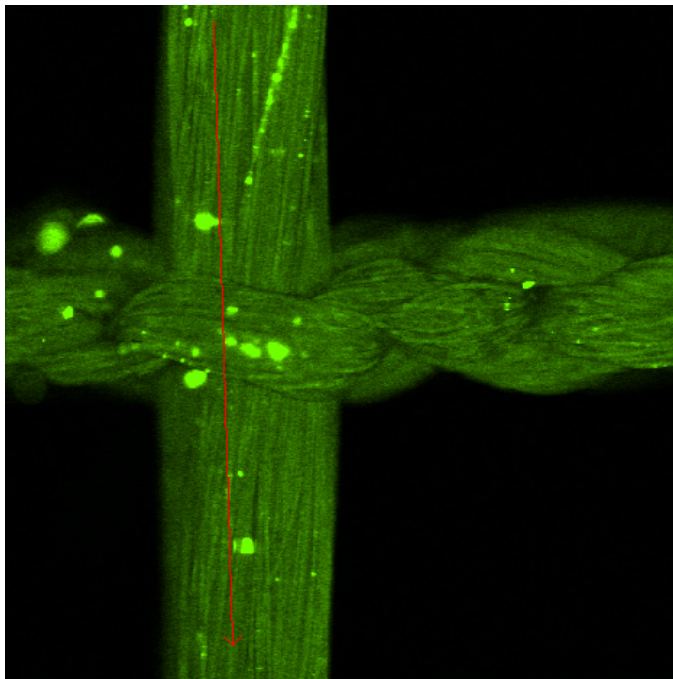


Abbildung 20 CLSM Parietex (PE) nach Carboxy-FITC Beschichtung

5.4 Proliferationstest

Mit Hilfe des Zellproliferationstests sollte zum einen die PEI-Beschichtung nachgewiesen werden. Zum anderen sollten Unterschiede im Anwachsverhalten von Fibroblasten innerhalb der unbeschichteten Netze und im Vergleich zu PEI-beschichteten Netzen untersucht werden. Dazu wurden von den Netzen Optilene, Premilene und Parietex jeweils 16 Proben und vom Infinit Mesh 17 Netzproben nach 2 und 24 Stunden untersucht.

Die Auszählung erfolgte mittels Zellcounter. Der durchgeführte Levene-Test war signifikant und wies keine Gleichheit der Varianzen auf ($p < 0,0051$). Wie in Tabelle 10 ersichtlich, gibt es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Materialien ($p < 0,001$), den Beschichtungen ($p < 0,001$) und den Messzeiten ($p < 0,001$), wobei es weder Wechselwirkungen zwischen Material und Beschichtung ($p < 0,077$) noch zwischen Beschichtung und Messzeitpunkten ($p < 0,544$) oder allen 3 Faktoren ($p < 0,067$) gibt. Material und Messzeit ($p < 0,001$) könnten sich allerdings statistisch beeinflussen.

Tabelle 10 Globaltest für Zellproliferation**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Sig.
Material	,000
Beschichtung	,000
Messzeit	,000
Material * Beschichtung	,076
Material * Messzeit	,000
Beschichtung * Messzeit	,543
Material * Beschichtung * Messzeit	,066

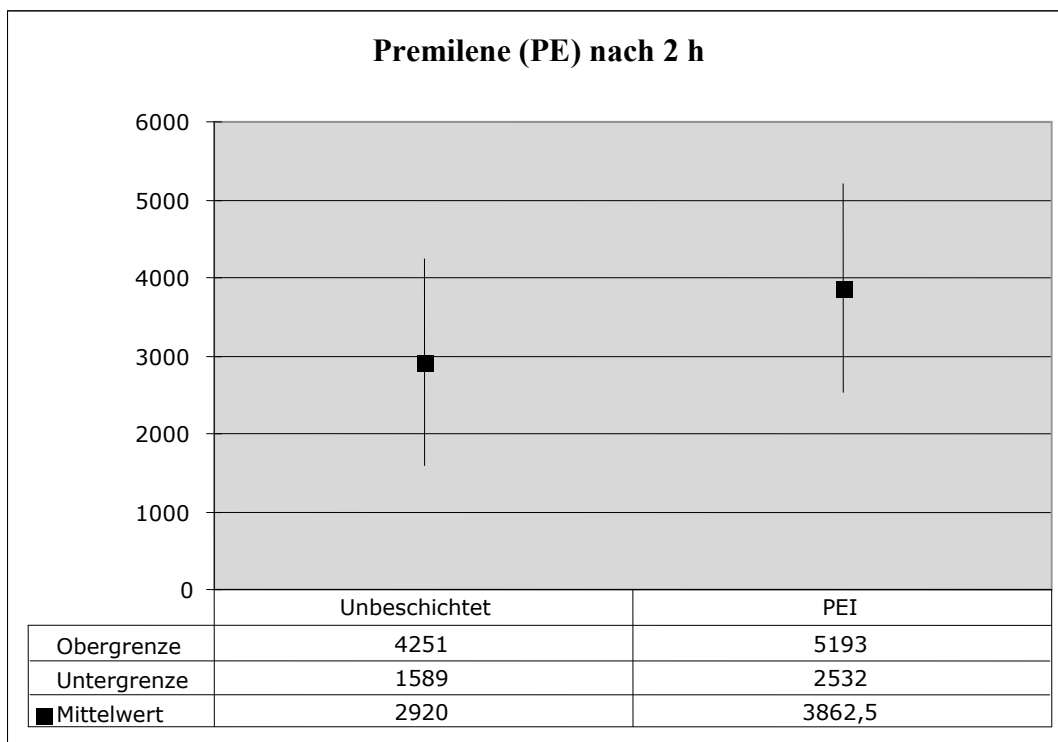
Auf Grund dieser Ergebnisse wurde eine 3-faktorielle ANOVA durchgeführt, welche die beschichteten und unbeschichteten Materialien nach Messzeiten verglich (siehe Tab. 11 bis 14).

Die nachfolgenden Abbildungen 21 bis 28 zeigen grafisch die ausgezählten Zellen der Netzproben nach einer Messzeit von 2 und 24 Stunden. Der Mittelwert ist dabei grafisch als Quadrat dargestellt und die senkrecht verlaufende Linie markiert das 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem * gekennzeichnet. Alle Netzproben wurden statistisch auch auf Wechselwirkungen zwischen Beschichtung und Messzeit untersucht. Eine signifikante Interaktion fand sich lediglich bei dem Infinit Mesh von Gore ($p < 0,013$).

Die Daten zeigen, dass bei den beschichteten Proben der Netze Optilene Elastic, Infinit Mesh und Parietex bei beiden Messzeitpunkten mehr Zellen nachgewiesen werden konnten als bei den unbeschichteten Netzen. Eine Signifikanz ließ sich dabei beim Optilene Elastic nach 24 Stunden ($p < 0,035$), beim Infinit Mesh nach 24 Stunden ($p < 0,001$) und beim Parietex-Netz nach 2 Stunden ($p < 0,021$) nachweisen. Auf dem beschichteten Premilene Netz wuchsen lediglich nach 2 Stunden mehr Zellen, als bei dem unbehandelten Netz. Dieses Ergebnis war aber nicht statistisch signifikant ($p < 0,298$). Nach 24 Stunden waren auf den unbehandelten Premilene-Proben mehr Zellen nachweisbar.

Tabelle 11 ANOVA für Proliferation auf Premilene**Paarweise Vergleiche**

Messzeit	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
2 h	unbeschichtet	PEI	-,942	,864	,297
24 h	unbeschichtet	PEI	,567	,864	,524

**Abbildung 21 Proliferation Premilene nach 2 Stunden**

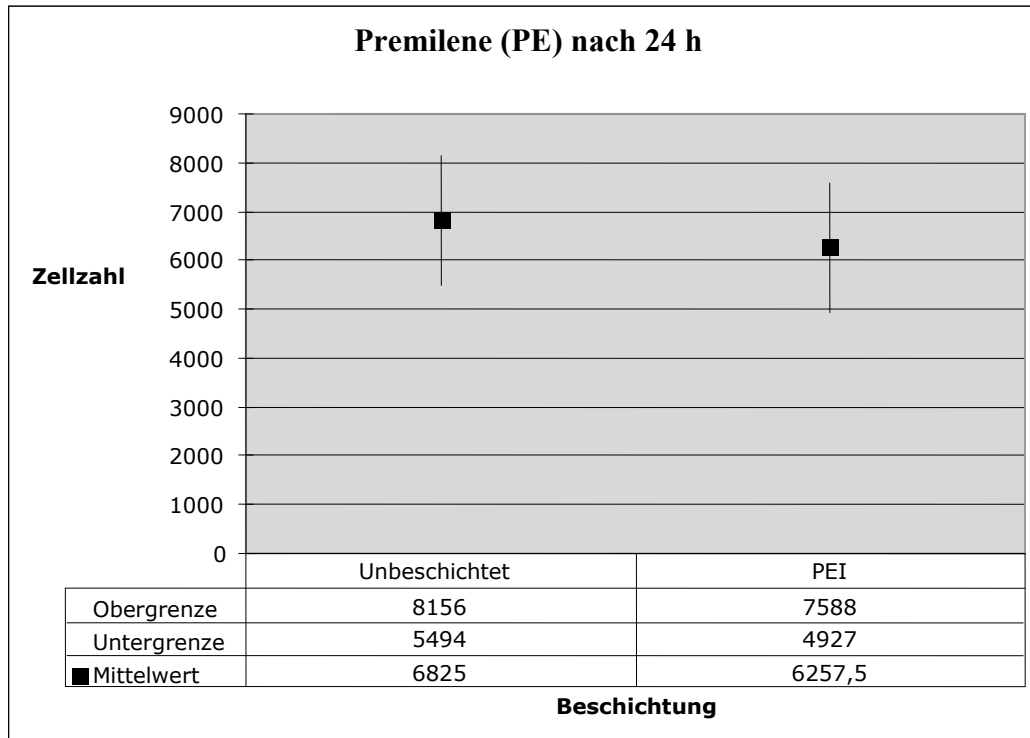


Abbildung 22 Proliferation Premilene nach 24 Stunden

Tabelle 12 ANOVA für Proliferation auf Optilene Elastic

Paarweise Vergleiche

Messzeit	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
2 h	unbeschichtet	PEI	-1,960	1,382	,181
24 h	unbeschichtet	PEI	-3,303 [*]	1,382	,034

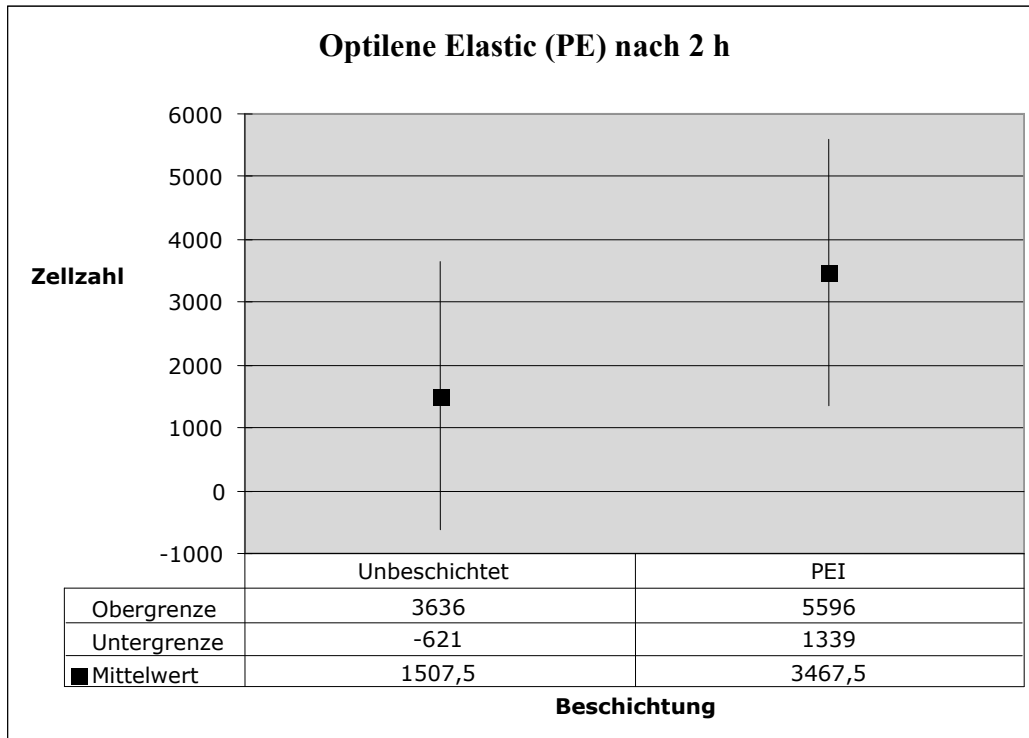


Abbildung 23 Proliferation Optilene Elastic nach 2 Stunden

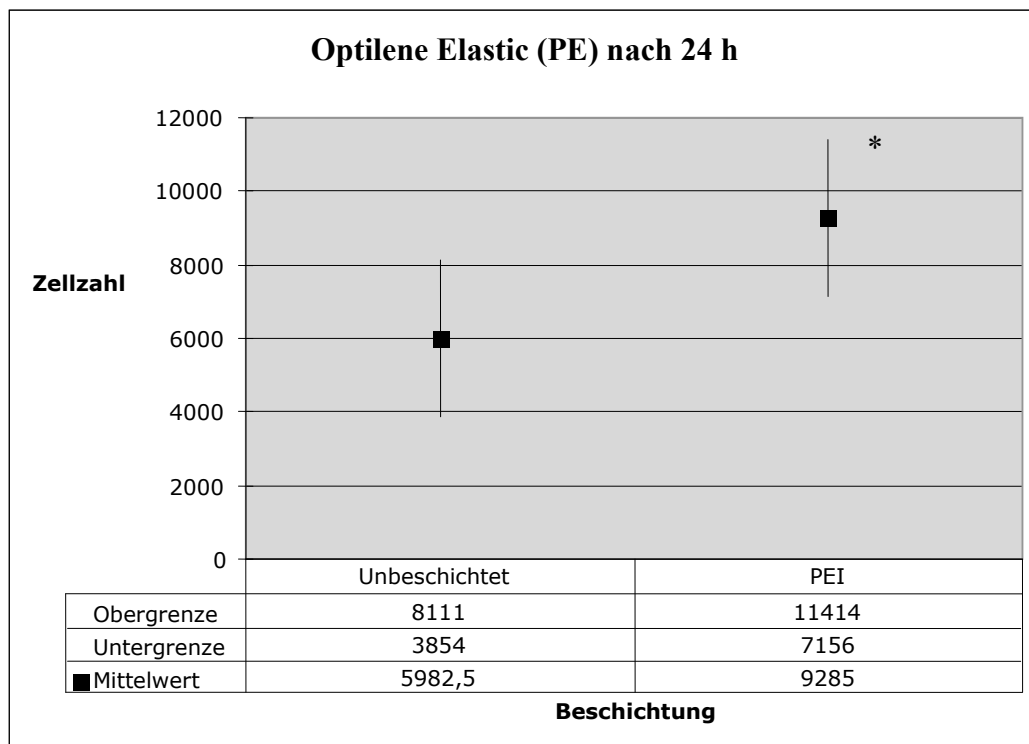
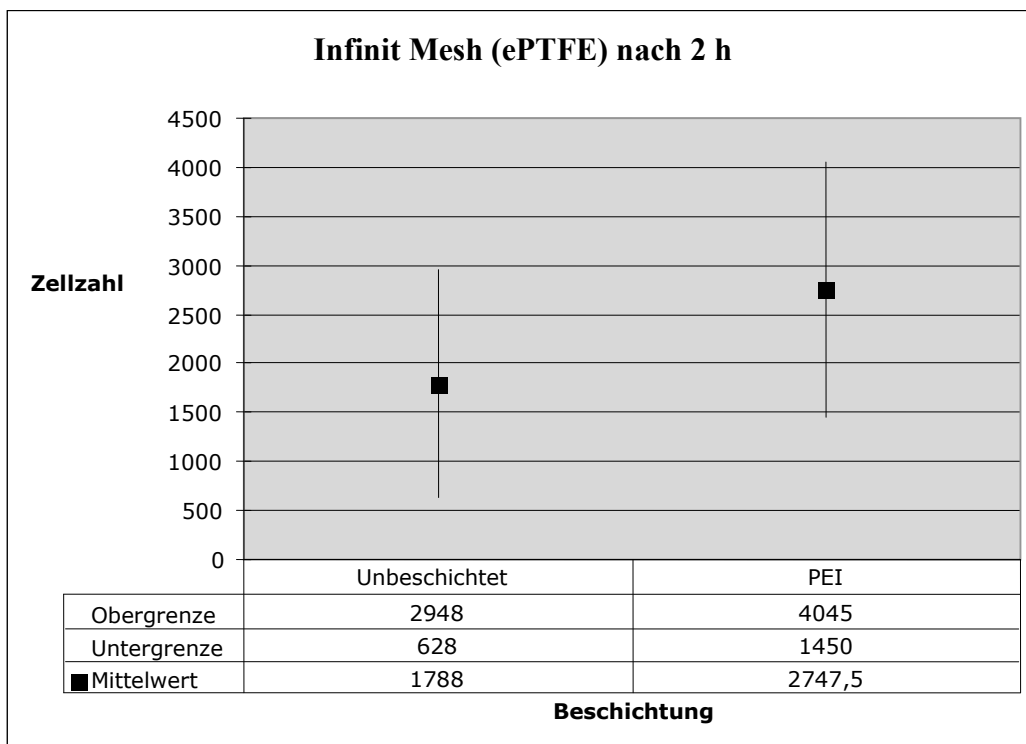


Abbildung 24 Proliferation Optilene Elastic nach 24 Stunden

Tabelle 13 ANOVA für Proliferation auf Infinit Mesh**Paarweise Vergleiche**

Messzeit	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
2 h	unbeschichtet	PEI	-,959	,806	,255
24 h	unbeschichtet	PEI	-4,360 [*]	,849	,000

**Abbildung 25 Proliferation Infinit Mesh nach 2 Stunden**

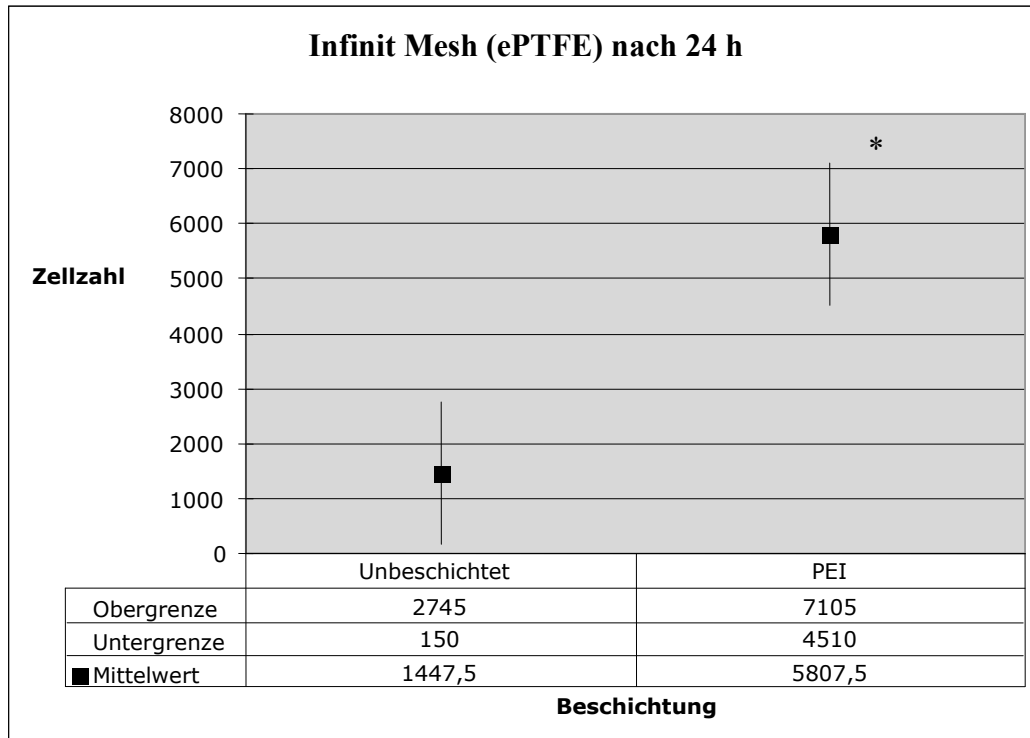


Abbildung 26 Proliferation Infini Mesh nach 24 Stunden

Tabelle 14 ANOVA für Proliferation auf Parietex

Paarweise Vergleiche

Messzeit	(I)Beschichtung	(J)Beschichtung	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a
2 h	unbeschichtet	PEI	-2,661 [*]	1,002	,020
24 h	unbeschichtet	PEI	-,850	1,056	,435

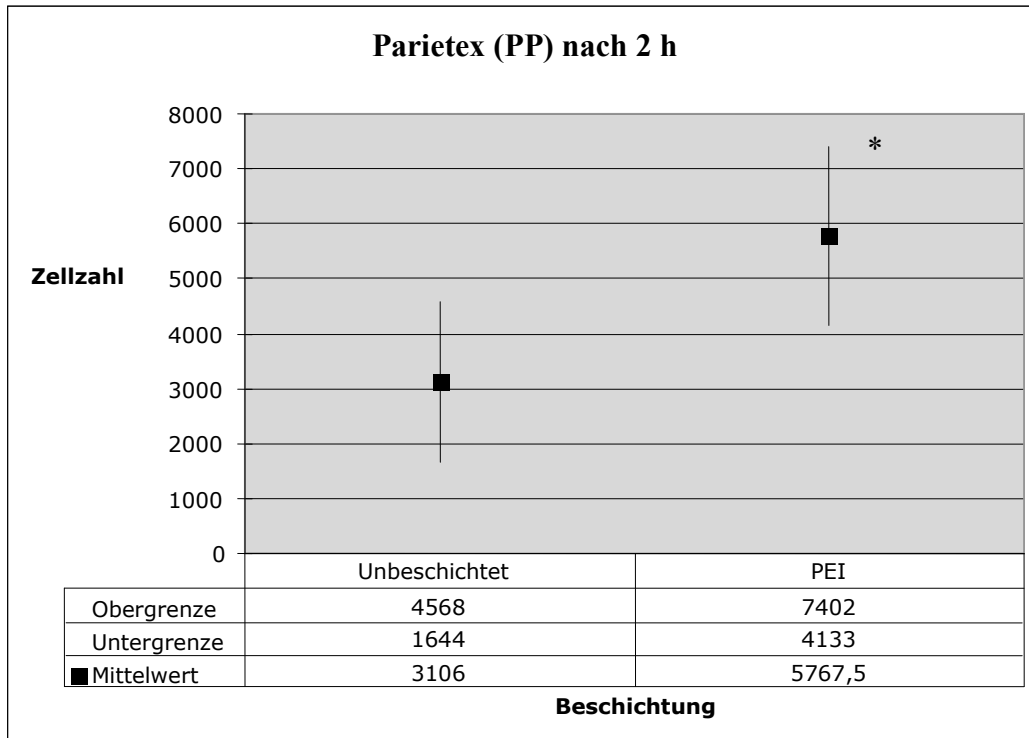


Abbildung 27 Proliferation Parietex nach 2 Stunden

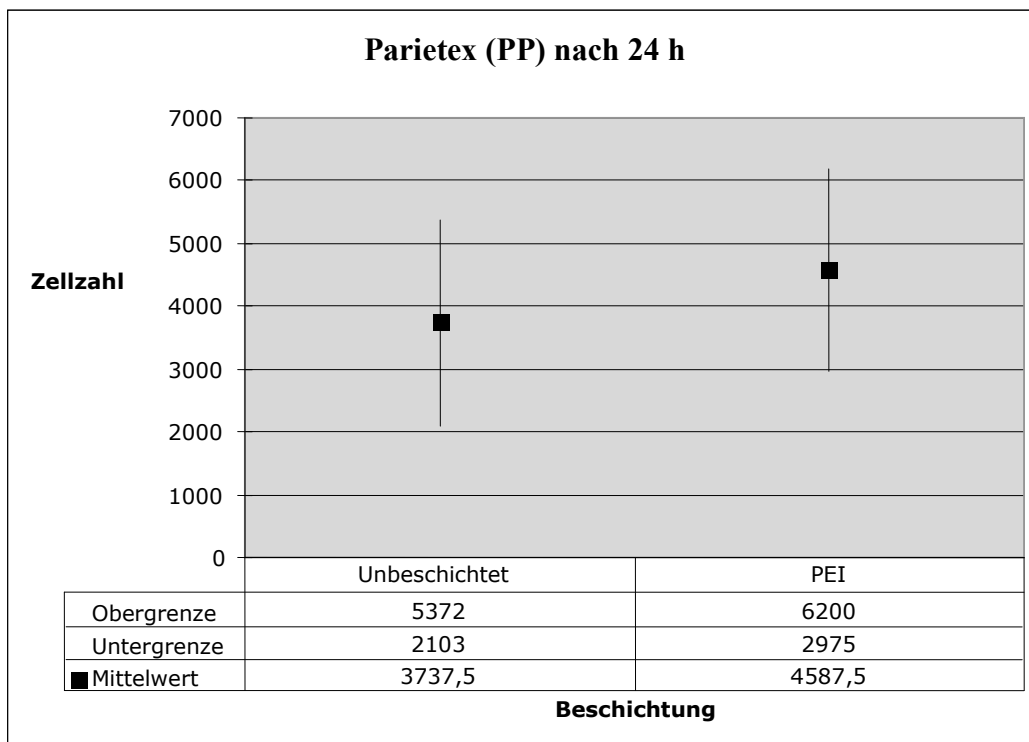


Abbildung 28 Proliferation Parietex nach 24 Stunden

5.5 Zellnachweis mittels Elektronenmikroskopie

Nachdem die Netzproben mit Goldstaub behandelt und die Zellen auf den Netzen fixiert worden waren erfolgte die Elektronenmikroskopie. Dabei wurden die Proben auf vorhandene Fibroblasten gescannt und diese optisch ausgezählt. Abbildung 29 zeigt ein ProLite Netz in verschiedenen Vergrößerungen. Diese Bilder stehen exemplarisch für alle untersuchten Proben. In den Untersuchungen ließen sich bei keiner Netzprobe elektronenmikroskopisch Zellen nachweisen. Auf mehreren Netzen ließen sich allerdings die auf dieser Abbildung erkennbaren hellen Auflagerungen nachweisen.

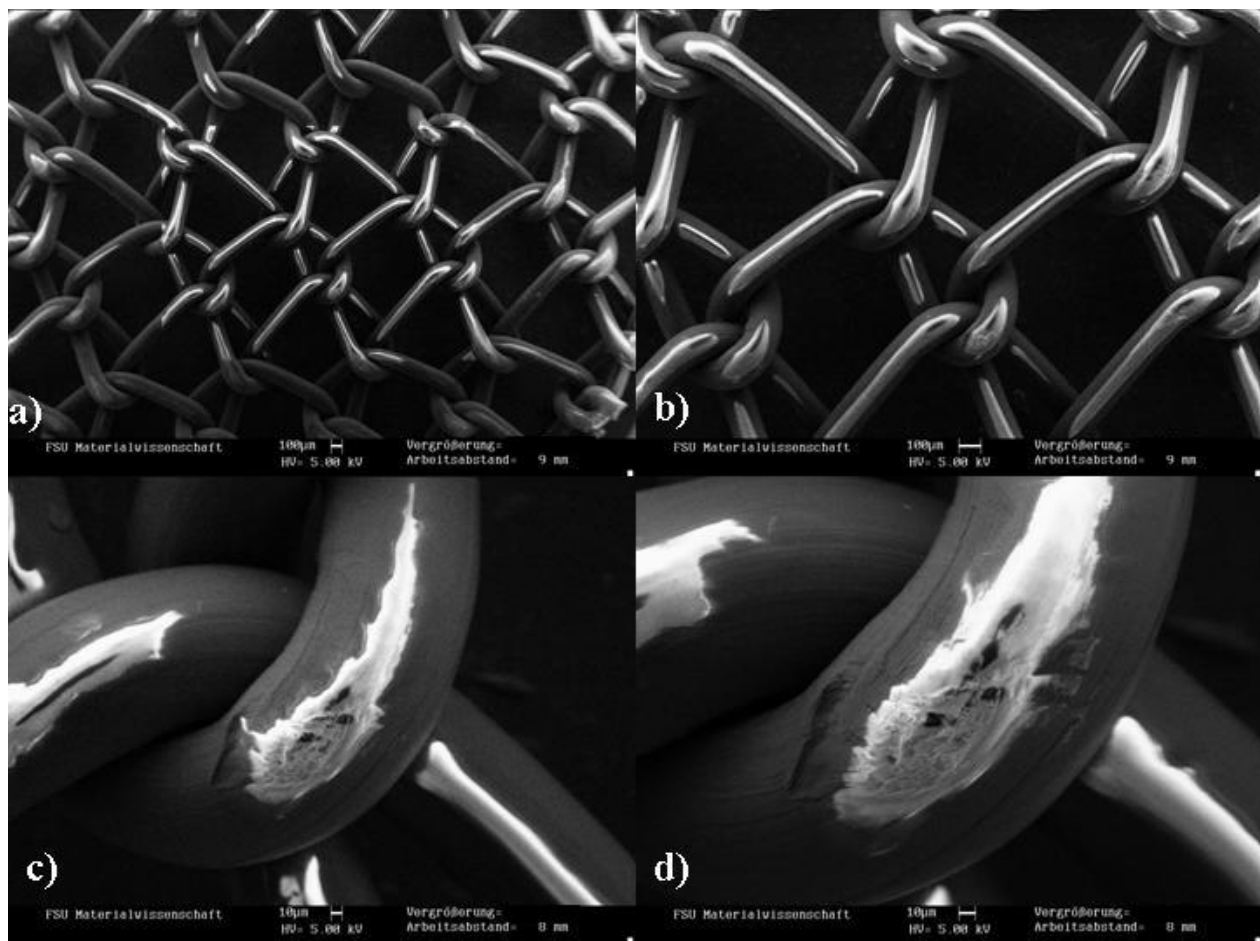


Abbildung 29 REM, ProLite Netz nach Fixierung

a) 20-fache Vergrößerung, b) 40-fache Vergrößerung, c) 200-fache Vergrößerung, d) 300-fache Vergrößerung

5.6 Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Zytotoxizität der PEI-Beschichtung nach 24 Stunden untersucht (siehe Abschnitt 4.3.5). Alle Einzelwerte und der Mittelwert der Zellen in PEI-beschichteten Proben lagen über denen der Kontrollzellen (siehe Tab. 15). Ergänzend liegt der Mittelwert der beschichteten Proben über dem der unbeschichteten Netze.

Außerdem wurden die Proben statistisch analysiert. Zunächst wurde dabei ein Levene-Test auf Varianzgleichheit (Streuung) durchgeführt (siehe Tab. 16). Dabei zeigten sich bei den Proben von Premilene, Optilene und Infinit Mesh keine signifikante Gleichheit der Varianzen. Der entsprechend durchgeführte T-Test (siehe Tab. 16) verglich statistisch die Mittelwerte der 3 Kontrollproben mit 3 beschichteten Netzproben des jeweiligen Materials und war ebenfalls nicht signifikant. Lediglich beim Parietex Netz ließ sich im Levene-Test eine signifikante Gleichheit der Varianz nachweisen und auch im T-Test eine (nicht signifikante) Tendenz ($p < 0,053$) zur Gleichheit der Mittelwerte erkennen.

Tabelle 15 MTT-Test für Zytotoxizität

Kontroll-Zellen	Zellen auf unbeschichteten Netzen	Zellen auf PEI-Beschichtung
0,171	0,187	0,203
0,191	0,190	0,204
0,173	0,206	0,221
	0,190	0,198
	0,179	0,848
	0,241	0,209
	0,184	0,184
	0,205	0,202
	0,307	0,204
	0,249	0,322
	0,305	0,376
	0,172	0,228
Mittelwert: 0,178	Mittelwert: 0,218	Mittelwert: 0,283

Tabelle 16 Toxizitätstest bei unabhängigen Stichproben mit PEI-Beschichtung

Material	Levene-Test der Varianzgleichheit	T-Test für die Mittelwertgleichheit	
	Signifikanz	Signifikanz (2-seitig)	
		Varianzen sind gleich	Varianzen sind nicht gleich
Premilene	,018	,327	,380
Optilene	,031	,163	,223
Infinif	,036	,238	,297
Parietex	,371	,052	,060

6 Diskussion

6.1 Allgemeine Aspekte

Seit der Einführung von Netzmaterialien in die Hernienchirurgie durch Usher (Usher et al. 1958) und die Entwicklung der modifizierten, so genannten spannungsfreien Bruchoperation nach Stoppa, Lichtenstein und anderen (Lichtenstein et al. 1989), sind Netzprothesen zum Goldstandard in der Hernienchirurgie avanciert (Hernandez-Gascon et al. 2011). Insbesondere die Senkung der Rezidivrate war dafür ein ausschlaggebender Punkt: allein durch die Einführung von Netzen bei der RepARATION von Bauchwandhernien konnte diese um 30-50 % verringert werden (Sergent et al. 2010). Weltweit werden heutzutage ca. 1 Million Netzprothesen pro Jahr eingesetzt (Huber et al. 2012). Doch trotz dieses riesigen Marktes mit immer neuen Produkten und der rasanten Entwicklung der verwendeten Materialien ist das optimale Herniennetz noch nicht gefunden. Dem modernen Chirurgen stehen damit eine Vielzahl von Operationstechniken und eine unüberschaubare Palette von Implantatmaterialien zur Verfügung, welche bei der Patientenversorgung berücksichtigt werden müssen.

Aktuelle Herniennetze unterscheiden sich vor allem in den verwendeten Polymeren, aber auch Parametern wie Faserdichte, Textilstruktur und -design, Materialzusammensetzung, Porengröße, Gewicht, Elastizität und Gewebereaktion (Saberski et al. 2011, Seiler et al. 2010). Während der Fokus am Anfang der Implantatentwicklung auf der Optimierung makroskopischer Eigenschaften wie kleinerer Poren, niedrigeres Gewicht und größerer Flexibilität lag, wurden in den letzten Jahren auch die Oberflächen der verwendeten Polymere durch Beschichtungen verbessert, was zur Gruppe der Composites führte (Ladurner et al. 2011, Scheidbach et al. 2011).

Polyethylenimin, welches seit den 1940er Jahren industriell produziert wird, ist eines der am besten bekannten und untersuchten kationischen Polymere und wird heute vor allem als non-viraler Vektor in der Genforschung verwendet (Hu et al. 2010, Segut 2010, Chu et al. 2011).

In experimentellen Beschichtungen mit Polykationen zeigte sich, dass insbesondere PEI die Zelladhäsion und -proliferation fördert, das Komplementsystem aktiviert und sogar auf PTFE haftet (Lakard et al. 2004, Toda et al. 2008, Moby et al. 2007, Liu et al. 2009). Diese Eigenschaften machen es als Beschichtung auf Netzprothesen besonders interessant.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, Proben von 4 verschiedenen Herniennetzen mit Polyethylenimin zu beschichten. Die Auswirkungen in Bezug auf die Fibroblastenproliferation und -vitalität im Vergleich zu den unbeschichteten Netzproben wurden

untersucht und durch Zellzählung, Elektronenmikroskopie und MTT-Test objektiviert. Der Nachweis der PEI-Beschichtung erfolgte mittels fluoreszenzmikroskopischer und spektrometrischer Verfahren. XPS-Analyse, Zellzählung und Toxizitätstest wurden statistisch erfasst und anschließend einer Prüfung auf signifikante Unterschiede zugeführt.

6.2 Bewertung der verwendeten Methoden und deren Ergebnisse

6.2.1 Bewertung der Herniennetzauswahl

Die für diese Untersuchung verwendeten Herniennetze wurden aufgrund grundsätzlicher materialbezogener theoretischer Überlegungen aus einem Portfolio kommerziell erhältlicher und am UKJ verwendeter Netze ausgewählt. Im Vorfeld der Arbeit wurde eine Vielzahl von Netzprothesenherstellern angeschrieben und gebeten, Netze zur Verfügung zu stellen. Dabei lag der Schwerpunkt der Auswahl auf einem möglichst breit gefächerten Probenfeld, wobei insbesondere Netze untersucht werden, welche auch aktuell zur Patientenversorgung an der Uniklinik Jena eingesetzt werden. Die Netze wurden nach Stoffklassen eingeteilt, wobei die 3 weltweit in der Hernienchirurgie am häufigsten eingesetzten Polymere (Polyester, Polypropylen und Polytetrafluorethylen) vertreten sein sollten. Die Auswahl der untersuchten Herniennetze hat damit keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit.

6.2.2 Bewertung der statistischen Analyse

Bei der statistischen Auswertung der hier vorliegenden Daten wurde eine Normalverteilung angenommen. Aufgrund des untersuchungsbedingten, geringen Stichprobenumfanges ist diese am ehesten wahrscheinlich. Sofern die Normalverteilung zutreffend ist, liefern die hier verwendeten Tests reliable und valide Aussagen. Außerdem verringert die eingeschränkte Probenanzahl die Aussagekraft der statistischen Verfahren. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass untersucherabhängige Fehlerquellen die hier erfolgten Messungen beeinflussen können. Dazu zählen produktionsbedingte Schwankungen der verwendeten Netz- und Beschichtungsmaterialien, aber auch geringe Abweichungen in den Untersuchungsbedingungen, die sich trotz größter Sorgfalt nicht immer ausschließen lassen.

6.3 Bewertung der Zellproliferation und deren Ergebnisse

6.3.1 Bewertung der Fibroblastenproliferation mittels Zellzähler

Nach Inkubation der Zellen erfolgte die Zellzählung mit Hilfe eines Zellcounters nach 2 und 24 Stunden. Als Zellkultur wurden Mausfibroblasten ausgewählt, da diese Zellgattung besonders für die Wundheilung, -kontraktion und -stabilität sowie für das Ausmaß der Inflammation und Fremdkörperreaktion eine wichtige Rolle spielt (Gonzalez et al. 2005).

Hierbei zeigte sich bei den PEI-beschichteten Netzen Optilene Elastic und Infinit Mesh eine signifikante Zunahme des Zellwachstums nach 24 Stunden, bei Parietex bereits nach 2 Stunden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Gruppe Brunot et al., welche ebenfalls eine schnelle Zelladhäsion von Fibroblasten und Osteoblasten auf PEI-beschichteten Oberflächen aus Nickel und Titanium in den ersten Stunden beobachten konnte (Brunot et al. 2007). Auch Liu et al. konnten eine gute Proliferation von menschlichen Osteosarkomzellen (MG63) auf PEI-beschichteten Poly-(L-Lactid)Filmen beobachten und die Gruppe Lakard et al. wies ein gutes Anwachsverhalten von Rattenneuronen in den ersten 72 Stunden auf PEI-beschichteten Oberflächen nach (Liu et al. 2009, Lakard et al. 2005, Lakard et al. 2004).

Die beschichteten Netzproben von Premilene wiesen lediglich ein etwas erhöhtes, aber nicht signifikantes Zellwachstum nach 2 Stunden auf. Nach 24 Stunden waren auf der unbeschichteten Probe von Premilene mehr Zellen vorhanden. Dieses mangelnde Anwachsverhalten auf dem Premilene Netz ist am ehesten auf eine mangelhafte oder nicht erfolgreiche Beschichtung zurückzuführen. Außerdem zeigten die hier getesteten Polypropylenetze bereits unbeschichtet ein sehr gutes Zellwachstum, weshalb die PEI-Beschichtung nicht in dem Maße überlegen ist. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen überein. Demnach wachsen Polypropylenetze sehr gut in das umliegende Gewebe ein und Zelladhäsion und Vaskularisation sind im Durchschnitt stärker als bei Netzen aus PE und PTFE (Huber et al. 2012).

Am aussagekräftigsten sind die Ergebnisse beim Infinit Mesh von Gore. Hier zeigt sich über die gesamten 24 Stunden ein im Vergleich zum unbehandelten Netz expansives Zellwachstum auf den PEI-Proben, welches als Beschichtungsnachweis interpretiert werden kann. Diese Ergebnisse stimmen mit den in-vivo Beobachtungen von ePTFE-Netzen überein. Voskerician et al. konnten ein schlechteres Einwachsen von ePTFE Netzen im Rattenmodell nachweisen und auch Novitsky et al. konnten ähnliche Ergebnisse im Kaninchenmodell beobachten (Voskerician et al. 2006, Novitsky et al. 2008). Im Gegensatz dazu zeigten Jacob et al. in ihrer Studie am Tiermodell ein

vergleichbares Zelladhäsionsverhalten von Optilene und Infit Mesh, welches in dieser Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden konnte (Jacob et al. 2011). Klinge et al. zeigten hingegen in ihrer Studie eine im Vergleich zu PTFE vermehrte Fibroblastenproliferation auf PP-Netzen (Klinge et al. 1999). Diese Beobachtungen stimmen mit den hier vorliegenden Ergebnissen überein.

Beim Parietex-Netz sieht man ein sehr schnelles und starkes Zellwachstum in den ersten 2 Stunden, welches danach wieder abfällt. Dies ist wahrscheinlich auf den im kurzfristigen zeitlichen Verlauf entstehenden Nährstoffmangel der zu stark proliferierenden Zellen zurückzuführen. Das PE-Material ist für seine allgemein gute Biokompatibilität bekannt und die schnelle Gewebeintegration von Polyester-Netzen wurde bereits von Gonzalez et al. und Scheidbach et al. beobachtet (Gonzalez und Ramshaw 2003, Scheidbach et al. 2011).

Bei den hier durchgeführten statistischen Analysen ist zu berücksichtigen, dass Wechselwirkungen zwischen Material und Messzeitpunkten bestehen können. Dadurch ist es möglich, dass sich die Interaktionen dieser Faktoren ergänzend oder gegenläufig verhalten und damit Einfluss auf die statistischen Ergebnisse nehmen. Bei den Netzproben von Gore fanden sich zusätzlich statistisch signifikante Interaktionen zwischen den Faktoren Beschichtung und Messzeit, welche sich dadurch statistisch ebenfalls beeinflussen könnten. Diese Effekte sind vor allem durch den geringen Probenumfang bedingt und vernachlässigbar klein.

6.3.2 Bewertung der Fibroblastenproliferation mittels Elektronenmikroskopie

Neben den Auswirkungen der PEI-Beschichtung auf die Netzoberfläche sollte mit der Elektronenmikroskopie auch die Fibroblastenproliferation optisch dargestellt werden.

Hierfür wurden die Zellen auf den Proben fixiert, mit Goldstaub beschichtet und unter dem Elektronenmikroskop begutachtet. Hierbei ließen sich auf keinem Netz Fibroblasten darstellen. Die hellen Auflagerungen, welche auf einigen der in dieser Arbeit vorliegenden Proben zu sehen waren, können am ehesten als Zellbestandteile, möglicherweise aber auch als Verschmutzungen der Oberfläche oder Aufnahme-Artefakte gewertet werden.

Als Grund für den nicht gelungenen Zellaufweis, sind Mängel im Fixierungsverfahren bzw. eine nicht ausreichende Haftung der Fibroblasten auf der Netzoberfläche denkbar. Die hier verwendete Fixierung mittels Glutaraldehyd in PBS und Ethanol ist zwar ein gängiges Untersuchungsverfahren, aber eventuell für die hier zu untersuchenden Proben nicht geeignet, da diese zu dem gewählten Zeitpunkt noch über keine ausreichende Haftung auf dem Netzmaterial

verfügten. Kapischke et al. konnten zwar in ihren in-vitro Untersuchungen Fibroblasten auf Herniennetzen elektronenmikroskopisch nachweisen, kultivierten aber die Zellen für insgesamt 7 Tage und fixierten diese über Nacht mit einer Karnovsky-Lösung (Kapischke et al. 2005). Weyhe et al. konnten eine Fibroblastenproliferation auf unbeschichteten Herniennetzen aus Polypropylen nach 24 Stunden lichtmikroskopisch nachweisen (Weyhe et al. 2008). Brunot et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass humane Fibroblasten auf PEI-beschichteten Nickel- und Titanumproben innerhalb der ersten 24 Stunden, trotz des hochmolekularen Polyethylenimin, ein gutes Adhäsions- und Proliferationsverhalten aufweisen und wiesen dies auch elektronenmikroskopisch nach (Brunot et al. 2007). Langer et al. gelang es in ihrer Studie mit humanen Fibroblasten, deren Wachstum auf PP-Herniennetzen unter dem Elektronenmikroskop (Vergrößerung: 200µm) nachzuweisen (Langer et al. 2005). Dafür verwendeten sie eine ähnliche Fixierungsmethode wie in dieser Arbeit, allerdings mit etwas niedrigerer Glutaraldehydkonzentration (2 % in 0,1 M Cacodylatpuffer), einer längeren Fixierungszeit von 2 Stunden und zur Trocknung der Proben einen „critical point dryer“. Zukünftige Arbeiten sollten versuchen durch schonendere Fixierungsmethoden die anhaftenden Zellen optisch nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit für den mikroskopischen Zellaufweis stellt das Environmental Rasterelektronenmikroskop (ESEM, engl. Environmental scanning electron microscope) dar. Hierbei werden die Proben einem geringeren Vakuum ausgesetzt, die Veränderungen durch das Evakuieren werden reduziert und die Bedampfung und Metallisierung der Proben entfällt. Nachteilig sind die geringere Auflösung und der wesentlich größere Messaufwand (Mulisch und Welsch 2010, Goodhew et al. 2001, Hawkes 1990).

6.4 Bewertung der Beschichtungsnachweise und deren Ergebnisse

6.4.1 Bewertung der Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) diene dem Nachweis der PEI-Beschichtung, da dieses Verfahren in der Materialwissenschaft bei der zerstörungsfreien Oberflächenanalyse dünner Schichten als besonders leistungsfähig gilt (Liu et al. 2009, Vissing 2007). Bis heute wurde es erfolgreich zur Identifikation von Elementen des Periodensystems (alle außer Helium und Wasserstoff), zur Bestimmung der Oxidationsstufen und des Bindungstyps eines Elements und der Elektronenstruktur von Molekülen bei Gasen, Festkörpern und Flüssigkeiten eingesetzt (Skoog et al. 1996). Außerdem kann es Informationen über die Integrität von Beschichtungen,

molekularen Diffusions- und Adsorptionsphänomenen sowie die Charakterisierung von Polymeroberflächen liefern (Crompton und Limited 2006).

Nachteile dieser Technik sind die hohen Kosten, die vom Einfallswinkel abhängige, zum Teil schlechte Tiefenauflösung und das für die Messungen nötige Ultra-Vakuum (Verma 2007, Weckhuysen et al. 2000). Die Genauigkeit der Ergebnisse ist außerdem abhängig von der Elektronenflugbahn, da nur Elektronen, deren Flugbahn in der Mitte des Raumes verläuft, vom Detektor registriert werden können (Czeslik et al. 2010). Der Auftreffwinkel der Elektronen kann durch Oberflächenmodifikationen, wie z. B. eine erhöhte Rauigkeit, maßgeblich beeinflusst werden und damit die quantitative XPS-Messung verändern (Spencer 2011).

Bei der Auswertung mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie zeigte sich im Vergleich zu den unbeschichteten Netzen bei allen beschichteten Proben ein Anstieg des N1s-Spektrums bei ca. 400 eV, welcher auf die zahlreichen im Polyethylenimin enthaltenen primären, sekundären und tertiären Amine zurückgeführt werden kann (Guo et al. 2011, Segut 2010, Morra und Cassinelli 1999). Dieser Anstieg kann als erfolgreiche Beschichtung gewertet werden.

Allerdings war die N1s-Zunahme nur bei zwei Netzen (Premilene und Parietex) signifikant. Als mögliche Ursache für diese Ergebnisse ist eine nicht flächendeckende Beschichtung denkbar. Dies würde sich auch mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie decken. Durch diese Inhomogenität ist es möglich, dass der eingesetzte Röntgenstrahl auf unbeschichtetes Netzmaterial trifft und sich dadurch in der Summe eine geringe Stickstoffkonzentration nachweisen lässt. Zusätzlich sind bei diesem Verfahren die geometrischen Eigenschaften der untersuchten Materialien zu berücksichtigen. Die hier verwendeten Netzproben bestehen aus komplexen dreidimensionalen Strukturen mit zum Teil vielfach miteinander verflochtenen Fäden mit rauer Oberfläche. Somit bietet das Untersuchungsmaterial nicht die für optimale Ergebnisse nötige plane Ebene mit glatter, gleichmäßiger Oberfläche. Dadurch ist es möglich, dass Röntgenstrahlen in unterschiedlichen Winkeln auf die zylindrische Probenoberfläche auftreffen und dadurch unterschiedliche Schichten der Proben analysiert werden. Außerdem sind die hier vorliegenden Herniennetze technische Polymere mit unbekannter chemischer Zusammensetzung. Dadurch ließen sich auch auf den unbehandelten Netzen Spuren von anderen Elementen (z. B. auch Stickstoff) nachweisen. Dies macht den Beschichtungs-Nachweis mit XPS schwierig und kann unter Umständen die Ergebnisse verfälschen. Dennoch ist das XPS-Verfahren, neben dem Proliferationsnachweis, die derzeit beste Untersuchungsmethode für diese Art von Beschichtungen auf Netzprothesen.

6.4.2 Bewertung der Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie diente dem Nachweis der PEI-Beschichtung mittels Carboxy-FITC. Seit seiner Einführung in den 1980er Jahren wurde dieses Verfahren in vielen Bereichen eingesetzt und wird heute in Medizin und Biologie hauptsächlich für die Analyse von Zellen und Biofilmen verwendet (Wilkinson und Schut 1998). Von Vorteil sind bei der CLSM-Untersuchung unter anderem die hohe Auflösung, die homogene Probenbelichtung und die Möglichkeit zur digitalen Speicherung und Nachbearbeitung.

Nachteilig sind die geringe Scangeschwindigkeit und der potentielle Lichtschaden bei 3D-Bild-Rekonstruktionen (Datta et al. 1996, Mason 1999, Hof et al. 2005, Feinendegen 2003). Um die gewünschten Strukturen unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, werden auch Fluoreszenzmarker wie beispielsweise FITC, TRITC oder BODIPY eingesetzt (Wilkinson und Schut 1998). Der in dieser Arbeit verwendete Marker Carboxy-Fluoresceinisothiocyanat (Carboxy-FITC) gehört zur Gruppe der Fluorochrome, ist negativ geladen, präzipitiert bei einem $\text{pH} < 3$ und leuchtet unter dem Mikroskop grün auf (Rost 1995, Decher und Schlenoff 2006).

Um einen Übergang zwischen unbeschichteter und beschichteter Seite sichtbar zu machen, wurden die Proben in dieser Arbeit mit Klebestreifen abgeklebt und danach unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop betrachtet.

Bei keiner der hier untersuchten Netze zeigte sich ein klarer Übergang mit steigender Signalintensität. Bruno et al. berichteten in ihrer Arbeit über Multilayer-Beschichtungen auf Titanium über ähnliche Probleme bei dem Beschichtungsnachweis mittels CLSM, insbesondere bei sehr dünnen Schichten (Brunot et al. 2008). Als Ursache hierfür wäre eine nicht erfolgreiche PEI-Beschichtung denkbar. Diese wurde allerdings nach den gleichen Kriterien wie bei allen anderen Proben vorgenommen. Vordergründig sind vor allem Mängel in der angewendeten Methode mit Carboxy-FITC als Hauptgrund anzusehen. Durch die komplexe Netzstruktur ist es möglich, dass der Fluoreszenzfarbstoff auch abgeklebte Anteile erreichen konnte und somit das Ergebnis verfälscht hat.

Allerdings lässt sich mit Hilfe dieses Verfahrens die Inhomogenität der Beschichtung optisch darstellen. Wie auf den Bildern zu sehen, liegt die PEI-Beschichtung nicht gleichmäßig vor, sondern scheint viel mehr inselförmig auf den Netzfäden verteilt zu sein und an den Knotenpunkten zu kumulieren. Diese Eigenschaft muss bei allen anderen Untersuchungsverfahren berücksichtigt werden.

6.5 Bewertung des Zellvitalitätsnachweises und dessen Ergebnisse

6.5.1 Bewertung des MTT-Tests

Durch den MTT-Test sollte in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwiefern sich die Polyethylenimin-Beschichtung auf die Lebendigkeit der Zellen auswirkt. Dieser sensitive, praktische und schnell durchführbare Test zeigt mittels einer Farbreaktion die Funktionsfähigkeit der mitochondrialen Dehydrogenasen an (Kirkpatrick et al. 1998).

Seit der Einführung von PEI in die medizinische Forschung wird der Einsatz vor allem durch dessen Zytotoxizität limitiert. Eine Reihe von Studien untersuchte daraufhin, in welcher Form sich Polykationen negativ auf die Zellvitalität auswirken. Es ergaben sich daraus starke Hinweise, dass PEI mit steigender Molmasse stärkere elektrostatische Interaktionen mit Zellen ausbildet. Damit werden deren Membranen zerstört und der Zelltod herbeigeführt (Drake et al. 2010, Moghimi et al. 2005). Auch ein höherer Grad von Verzweigungen in der Molekülstruktur scheint sich negativ auf das Zellüberleben auszuwirken (Huh et al. 2007). Grandinetti et al. untersuchten die Zytotoxizitäts-Mechanismen von PEI genauer und kamen zu dem Schluss, dass PEI mit einer höheren Molmasse die Zellpermeabilität und die Apoptoserate stärker induziert, als niedermolekulares Polyethylenimin. Außerdem scheinen diese Polymere auch die Kernmembran von Zellen zu beeinflussen (Grandinetti et al. 2011). Gao et al. wiesen in ihrer Studie mit Nieren- und Leberzelllinien nach, dass Polyethylenimin nicht nur mit einer erhöhten Nekrose- und Apoptoserate assoziiert ist, sondern auch über Autophagie zum Zelltod führen kann (Gao et al. 2011). Nichtsdestotrotz stellt die Analyse der metabolischen Zellaktivität (z. B. durch MTT oder CCK8-Test) das gängigste Verfahren für ihren Funktionsnachweis dar, nachdem die mitochondrial vermittelte Apoptose einer der Hauptmechanismen der Zytotoxizität zu sein scheint (Hunter und Moghimi 2010).

Der Großteil der Studien untersuchte aber lediglich die zelltoxischen Eigenschaften von gelösten Polyethylenimin in Gentransferprozessen und nicht die als dünne Schicht, an eine Oberfläche gebundene Form, wie sie in dieser Arbeit vorliegt (Heurich et al. 2011). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften von PEI-Beschichtungen maßgeblich von Faktoren wie pH-Wert, Salzgehalt der Polymerlösung und der Oberflächenspannung abhängen und darüber auch die Adhäsion, Proliferation und Vitalität von Zellen beeinflussen können (Niepel et al. 2009, Bieker und Schönhoff 2010, Decher et al. 1992). Heurich et al. konnten in Versuchen mit Osteoblasten keine Zytotoxizität von nieder- und hochmolekularen Polyethylenimin-Beschichtungen auf Titan feststellen und führten diesen Effekt

auf die stabile elektrostatische Anhaftung von PEI auf der Oberfläche zurück, wodurch es von anhaftenden Zellen nicht mehr absorbiert werden kann (Heurich et al. 2011). Auch die hier vorliegenden Tests ergaben keinerlei Hinweis auf eine Zellschädigung. Der hier vorgenommene MTT-Test lieferte bei den PEI-beschichteten Proben im Vergleich zu den Kontrollen durchgehend stärkere Signale, was für eine hohe Zellvitalität spricht. Die statistischen Tests zeigen, dass die Gruppen zwar unterschiedlich stark streuen, aber die Mittelwerte der Kontrollgruppe sich nicht signifikant von den beschichteten Proben unterscheiden. Für die Intaktheit der Zellen spricht außerdem das expansive Zellwachstum im Proliferationstest. Deswegen ist für zukünftige Arbeiten auch die Bestimmung des prozentualen Anteils von vitalen und avitalen Zellen, mit Hilfe spezieller Färbungen denkbar.

Daraus lässt sich schließen, dass das hier als Beschichtung verwendete Polyethylenimin mit den Polymeren PP, PE und PTFE eine stabile Verbindung eingeht und dadurch die Zellmembranen der Fibroblasten nicht destabilisieren kann.

7 Schlussfolgerung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Polyethylenimin-Beschichtung auf Herniennetzen aus 3 unterschiedlichen Polymeren in-vitro untersucht. Mit Polypropylen, Polyester und ePTFE wurden die drei am häufigsten verwendeten Netztypen verwendet. Wegen seiner hervorragenden Zellproliferations- und Zelladhäsionseigenschaften wurde zur Oberflächenoptimierung das seit langem bekannte Polyethylenimin ausgewählt.

Ziel dieser Arbeit war es eine stabile Polyethylenimin-Beschichtung auf den Herniennetzen herzustellen und damit das Anwachsverhalten von Fibroblasten zu verbessern.

Als direkte Verfahren zum Beschichtungsnachweis wurden die Röntgenphotoelektronenspektroskopie und die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Beide Methoden zeigten Schwächen in der Durchführbarkeit und Aussagekraft bei den dreidimensionalen Netzstrukturen. Insgesamt liefert aber der Beschichtungsnachweis durch XPS die besseren Resultate und kann für weitere Untersuchungen empfohlen werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmalig, dass eine PEI-Beschichtung von Herniennetzen aus PP, PE und ePTFE möglich ist. Außerdem konnte durch Zellproliferationstests nachgewiesen werden, dass die Oberflächenmodifikation durch Polyethylenimin Fibroblasten schneller und zahlreicher anwachsen lässt. Dies gilt besonders für die Netze Optilene Elastic (PP, B. Braun[®]), Infinit Mesh (ePTFE, Gore[®]) und Parietex (PE, Covidien[®]). Ein optischer Nachweis im Elektronenmikroskop nach Zellfixation ist durch das hier verwendete Verfahren nicht gelungen. Hier sollten zukünftig andere Fixierungsmethoden oder das Environmental Rasterelektronenmikroskop zum Einsatz kommen. Der Zellvitalitätsnachweis durch den hier durchgeführten MTT-Test sollte besonders hervorgehoben werden, seit Polyethylenimin als potentiell zytotoxisch gilt. Mit dem hier verwendeten Verfahren konnte nach 24 Stunden keine Zellschädigung durch die PEI-Beschichtung festgestellt werden. Zukünftige Arbeiten sollten diese Ergebnisse durch längere Beobachtungszeiten und ergänzende Tests (z. B. Protein- und Genexpressionstests) verifizieren.

Insgesamt bietet die Polyethylenimin-Beschichtung die Möglichkeit, die heute verbreiteten Herniennetze effizient, schnell und kostengünstig zu optimieren. Auch der Einsatz von niedermolekularem oder modifiziertem Polyethylenimin und damit potentiell niedriger Toxizität, bei annähernd gleicher Wirkung auf Zelladhäsion und -proliferation, wäre denkbar. Bis eine

solche Beschichtung allerdings in der klinischen Routine zum Einsatz kommen kann, bedarf es einer Reihe weiterer Studien, deren Schwerpunkte sowohl auf Untersuchungen in der Zellkultur als auch der Überprüfung im Versuchstiermodell liegen sollten. Das Hauptaugenmerk sollte dabei neben der Biokompatibilität auf der weiteren Beurteilung der Zytotoxizität liegen, wobei zukünftige Arbeiten versuchen sollten, die hier erzielten Ergebnisse durch eine größere Stichprobenanzahl zu verifizieren.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Altankov G, Albrecht W, Richau K, Groth T, Lendlein A. 2005. On the tissue compatibility of poly(ether imide) membranes: an in vitro study on their interaction with human dermal fibroblasts and keratinocytes. *J Biomater Sci Polym Ed*, 16 (1):23-42.
- Anurov MV, Titkova SM, Shchegoleva NN, Mikhaleva LM, Tsitovich IG, Galushkina NV, Oettinger AP. 2008. Experimental study of the impact of the textile structure of mesh endoprostheses for the efficiency of reconstruction of the anterior abdominal wall. *Bull Exp Biol Med*, 145 (5):642-646.
- Ardenne M. 2005. Effekte der Physik und ihre Anwendungen. Frankfurt am Main: Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch, 213-214.
- Bieker P, Schönhoff M. 2010. Linear and Exponential Growth Regimes of Multilayers of Weak Polyelectrolytes in Dependence on pH. *Macromolecules*, 43 (11):5052-5059.
- Bieleman J. 2008. Additives for Coatings. John Wiley & Sons, 124-125.
- Bittner R, Schwarz J. 2011. Inguinal hernia repair: current surgical techniques. *Langenbecks Arch Surg*.
- Bottenbruch L. 1992. Technische Thermoplaste : Polycarbonate, Polyacetale, Polyester, Celluloseester. München Wien: Carl Hanser Verlag München Wien, 73-75.
- Briggs D. 1998. Surface analysis of polymers by XPS and static SIMS. Cambridge University Press, 69-70.
- Bringman S, Conze J, Cuccurullo D, Deprest J, Junge K, Klosterhalfen B, Parra-Davila E, Ramshaw B, Schumpelick V. 2010. Hernia repair: the search for ideal meshes. *Hernia*, 14 (1):81-87.
- Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosogeat B. 2007. Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*, 28 (4):632-640.
- Brunot C, Grosogeat B, Picart C, Lagneau C, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. 2008. Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium. *Dent Mater*, 24 (8):1025-1035.
- Bullinger H-J. 2007. Technologieführer : Grundlagen, Anwendungen, Trends. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 20-24.
- Campanelli G, Pettinari D, Cavalli M, Avesani EC. 2006. Inguinal hernia recurrence: Classification and approach. *J Minim Access Surg*, 2 (3):147-150.
- Chastan P. 2005. Tension-free inguinal hernia repair: a retrospective study of 3000 cases in one center. *Int Surg*, 90 (1):48-52.
- Choosakoonkriang S, Lobo BA, Koe GS, Koe JG, Middaugh CR. 2003. Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *J Pharm Sci*, 92 (8):1710-1722.
- Chu H, Gao J, Wang Y. 2011. Design, synthesis, and biocompatibility of an arginine-based polyester. *Biotechnol Prog*.
- Conze J, Rosch R, Klinge U, Weiss C, Anurov M, Titkova S, Oettinger A, Schumpelick V. 2004. Polypropylene in the intra-abdominal position: influence of pore size and surface area. *Hernia*, 8 (4):365-372.
- Costello CR, Bachman SL, Ramshaw BJ, Grant SA. 2007. Materials characterization of explanted polypropylene hernia meshes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 83 (1):44-49.
- Crompton TR, Limited RT. 2006. Polymer reference book. Rapra Technology Limited, 130.

- Czeslik C, Winter HSCCR, Seemann H, Winter R. 2010. Basiswissen Physikalische Chemie. Vieweg+Teubner Verlag, 167-168.
- Datta M, MacDougall BR, Fenton JM. 1996. Proceedings of the Symposium on High Rate Metal Dissolution Processes. Electrochemical Society, 35-36.
- Decher G, Schlenoff J. 2006. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials. John Wiley & Sons, 387-388.
- Decher G, Hong JD, Schmitt J. 1992. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210–211, Part 2 (0):831-835.
- Deeken CR, Abdo MS, Frisella MM, Matthews BD. 2011. Physicomechanical evaluation of polypropylene, polyester, and polytetrafluoroethylene meshes for inguinal hernia repair. *J Am Coll Surg*, 212 (1):68-79.
- Drake CR, Aissaoui A, Argyros O, Serginson JM, Monnery BD, Thanou M, Steinke JH, Miller AD. 2010. Bioresponsive small molecule polyamines as noncytotoxic alternative to polyethylenimine. *Mol Pharm*, 7 (6):2040-2055.
- Ehrenstein GW. 1999. Polymer Werkstoffe: Struktur - Eigenschaften - Anwendung. München, Wien: Carl Hanser Verlag München Wien, 1-19.
- Elias H-G. 2001. Makromoleküle, Industrielle Polymere und Synthesen. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1-25.
- Eliason BJ, Frisella MM, Matthews BD, Deeken CR. 2011. Effect of Repetitive Loading on the Mechanical Properties of Synthetic Hernia Repair Materials. *J Am Coll Surg*, 213 (3):430-435.
- Elsner P, Eyerer P, Hirth T. 2008. Kunststoffe : Eigenschaften und Anwendungen. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1204-1208.
- Emans PJ, Schreinemaker MH, Gijbels MJ, Beets GL, Greve JW, Koole LH, Bouvy ND. 2009. Polypropylene meshes to prevent abdominal herniation. Can stable coatings prevent adhesions in the long term? *Ann Biomed Eng*, 37 (2):410-418.
- Erhard G. 2008. Konstruieren mit Kunststoffen. Hanser Fachbuchverlag, 35-38.
- Estour E. 2005. Tolerance of hernia repair meshes. Update on laparoscopic hernia repair, 11:298-305.
- Eyerer P, Hirth T, Elsner P. 2008. Polymer Engineering: Technologien und Praxis. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-18.
- Feinendegen LE. 2003. Molecular nuclear medicine: the challenge of genomics and proteomics to clinical practice. Springer, 741-742.
- Feßmann J, Orth H. 2002. Angewandte Chemie und Umwelttechnik für Ingenieure Handbuch für Studium und betriebliche Praxis. Landsberg/Lech: ecomed Sicherheit, 101-114.
- Fitzgibbons RJ, Jr., Giobbie-Hurder A, Gibbs JO, Dunlop DD, Reda DJ, McCarthy M, Jr., Neumayer LA, Barkun JS, Hoehn JL, Murphy JT, Sarosi GA, Jr., Syme WC, Thompson JS, Wang J, Jonasson O. 2006. Watchful waiting vs repair of inguinal hernia in minimally symptomatic men: a randomized clinical trial. *JAMA*, 295 (3):285-292.
- Forbes SS, Eskicioglu C, McLeod RS, Okrainec A. 2009. Meta-analysis of randomized controlled trials comparing open and laparoscopic ventral and incisional hernia repair with mesh. *Br J Surg*, 96 (8):851-858.
- Förch R, Schönherr H, Jenkins ATA. 2009. Surface design: applications in bioscience and nanotechnology. Wiley-VCH, 493.

- Gao X, Yao L, Song Q, Zhu L, Xia Z, Xia H, Jiang X, Chen J, Chen H. 2011. The association of autophagy with polyethylenimine-induced cytotoxicity in nephritic and hepatic cell lines. *Biomaterials*, 32 (33):8613-8625.
- Geckeler K, Wacker R, Martini F, Hack A, Aicher W. 2003. Enhanced biocompatibility for SAOS-2 osteosarcoma cells by surface coating with hydrophobic epoxy resins. *Cell Physiol Biochem*, 13 (3):155-164.
- Gerthsen T. 2008. Chemie für den Maschinenbau 2: Organische Chemie für Kraft- und Schmierstoffe, Polymerchemie für Polymerwerkstoffe. Karlsruhe: Universitätsverlag Karlsruhe, 103 - 208.
- Gherghi I, Girousi ST, Thanou M, Voulgaropoulos AN, Tzimou-Tsitouridou R. 2005. Voltammetric study of interaction between polymers (PEI and TMO) and pDNA on a hanging mercury drop electrode. *J Pharm Biomed Anal*, 39 (1-2):177-180.
- Gonzalez R, Ramshaw BJ. 2003. Comparison of tissue integration between polyester and polypropylene prostheses in the preperitoneal space. *Am Surg*, 69 (6):471-476; discussion 476-477.
- Gonzalez R, Fugate K, McClusky D, 3rd, Ritter EM, Lederman A, Dillehay D, Smith CD, Ramshaw BJ. 2005. Relationship between tissue ingrowth and mesh contraction. *World J Surg*, 29 (8):1038-1043.
- Goodhew PJ, Humphreys FJ, Beanland R. 2001. *Electron Microscopy and Analysis*. Taylor & Francis, 166-167.
- Grandinetti G, Smith AE, Reineke TM. 2011. Membrane and Nuclear Permeabilization by Polymeric pDNA Vehicles: Efficient Method for Gene Delivery or Mechanism of Cytotoxicity? *Mol Pharm*.
- Grote K-H, Feldhusen J. 2011. *Taschenbuch für den Maschinenbau*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 73-74.
- Guo QF, Liu TT, Yan X, Wang XH, Shi S, Luo F, Qian ZY. 2011. Synthesis and properties of a novel biodegradable poly(ester amine) copolymer based on poly(L-lactide) and low molecular weight polyethylenimine for gene delivery. *Int J Nanomedicine*, 6:1641-1649.
- Halaweish I, Harth K, Broome AM, Voskerician G, Jacobs MR, Rosen MJ. 2010. Novel in vitro model for assessing susceptibility of synthetic hernia repair meshes to *Staphylococcus aureus* infection using green fluorescent protein-labeled bacteria and modern imaging techniques. *Surg Infect (Larchmt)*, 11 (5):449-454.
- Harper CA. 2006. *Handbook of plastics technologies: the complete guide to properties and performance*. McGraw-Hill, 2.9.
- Hawkes PW. 1990. *Advances in electronics and electron physics*. Academic Press, 4-16.
- Hellerich W, Harsch G, Haenle S. 2004. *Werkstoffführer Kunststoffe: Eigenschaften, Prüfungen, Kennwerte*. München, Wien: Carl Hanser Verlag 79-165.
- Hernandez-Gascon B, Pena E, Melero H, Pascual G, Doblare M, Ginebra MP, Bellon JM, Calvo B. 2011. Mechanical behaviour of synthetic surgical meshes: finite element simulation of the herniated abdominal wall. *Acta Biomater*, 7 (11):3905-3913.
- Heurich E, Zankovych S, Beyer M, Schnabelrauch M, Berg A, Jandt KD. 2011. A Comparison of the Cell Compatibility of Poly(ethyleneimine) with that of other Cationic Biopolymers Used in Applications at Biointerfaces. *Advanced Engineering Materials*, 13 (9):B285-B295.
- Hof M, Hutterer R, Fidler V. 2005. *Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells*. Springer, 104-130.
- Hollas JM, Beckendorf M, Wohlrab S. 2000. *Moderne Methoden in der Spektroskopie*. Springer, 273.

- Hollinsky C, Sandberg S, Koch T, Seidler S. 2008. Biomechanical properties of lightweight versus heavyweight meshes for laparoscopic inguinal hernia repair and their impact on recurrence rates. *Surg Endosc*, 22 (12):2679-2685.
- Horbinski C, Stachowiak MK, Higgins D, Finnegan SG. 2001. Polyethyleneimine-mediated transfection of cultured postmitotic neurons from rat sympathetic ganglia and adult human retina. *BMC Neurosci*, 2:2.
- Hu C, Peng Q, Chen F, Zhong Z, Zhuo R. 2010. Low molecular weight polyethylenimine conjugated gold nanoparticles as efficient gene vectors. *Bioconjug Chem*, 21 (5):836-843.
- Huber A, McCabe GP, Boruch AV, Medberry C, Honerlaw M, Badylak SF. 2012. Polypropylene-containing synthetic mesh devices in soft tissue repair: A meta-analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100 (1):145-154.
- Huh SH, Do HJ, Lim HY, Kim DK, Choi SJ, Song H, Kim NH, Park JK, Chang WK, Chung HM, Kim JH. 2007. Optimization of 25 kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery. *Biologicals*, 35 (3):165-171.
- Hunter AC, Moghimi SM. 2010. Cationic carriers of genetic material and cell death: a mitochondrial tale. *Biochim Biophys Acta*, 1797 (6-7):1203-1209.
- Jacob DA, Schug-Pass C, Sommerer F, Tannapfel A, Lippert H, Kockerling F. 2011. Comparison of a lightweight polypropylene mesh (Optilene(R) LP) and a large-pore knitted PTFE mesh (GORE(R) INFINIT(R) mesh)-Biocompatibility in a standardized endoscopic extraperitoneal hernia model. *Langenbecks Arch Surg*.
- Jenkins JT, O'Dwyer PJ. 2008. Inguinal hernias. *BMJ*, 336 (7638):269-272.
- Jin J, Schomisch S, Rosen MJ. 2009. In vitro evaluation of the permeability of prosthetic meshes as the possible cause of postoperative seroma formation. *Surg Innov*, 16 (2):129-133.
- Kaiser W. 2007. *Kunststoffchemie für Ingenieure : Von der Synthese bis zur Anwendung*. München: Carl Hanser Verlag München, 227-398.
- Kalweit A, Paul C, Peters S, Wallbaum R. 2012. *Handbuch für Technisches Produktdesign : Material und Fertigung, Entscheidungsgrundlagen für Designer und Ingenieure*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 75-134.
- Kapischke M, Prinz K, Tepel J, Tensfeldt J, Schulz T. 2005. Precoating of alloplastic materials with living human fibroblasts--a feasibility study. *Surg Endosc*, 19 (6):791-797.
- Keim W. 2006. *Kunststoffe : Synthese, Herstellungsverfahren und Apparaturen*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 163-166.
- Kerspe JH. 2000. *Aufgaben und Verfahren in der Oberflächenbehandlung*. Renningen: Expert Verlag, 94.
- Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Wagner M, Kohler H, van Kooten TG, Klein CL, Otto M. 1998. Current trends in biocompatibility testing. *Proc Inst Mech Eng H*, 212 (2):75-84.
- Klinge U, Klosterhalfen B, Muller M, Schumpelick V. 1999. Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias. *Eur J Surg*, 165 (7):665-673.
- Krieger H. 2009. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner, 160.
- Kröhne L. 2009. *Untersuchungen zur Anwendbarkeit von Polyelektrolytmultischichten für Drug-Eluting Stents zur lokalen Freisetzung von Paclitaxel [Dissertation]*.
- Kurzweil P, Scheipers P. 2012. *Chemie, Grundlagen, Aufbauwissen, Anwendungen und Experimente*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner, 58.
- Ladurner R, Chiapponi C, Linhuber Q, Mussack T. 2011. Long term outcome and quality of life after open incisional hernia repair--light versus heavy weight meshes. *BMC Surg*, 11:25.

- Lakard S, Herlem G, Valles-Villareal N, Michel G, Propper A, Gharbi T, Fahys B. 2005. Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Biosens Bioelectron*, 20 (10):1946-1954.
- Lakard S, Herlem G, Propper A, Kastner A, Michel G, Vallès-Villarreal N, Gharbi T, Fahys B. 2004. Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. *Bioelectrochemistry*, 62 (1):19-27.
- Lakard S, Morrand-Villeneuve N, Lesniewska E, Lakard B, Michel G, Herlem G, Gharbi T, Fahys B. 2007. Synthesis of polymer materials for use as cell culture substrates. *Electrochimica Acta*, 53 (3):1114-1126.
- Langer C, Schwartz P, Krause P, Mohammadi H, Kulle B, Schaper A, Fuzesi L, Becker H. 2005. [In-vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure]. *Chirurg*, 76 (9):876-885.
- Lautenschläger KH, Schröter W. 2007. Taschenbuch der Chemie. Deutsch, 781.
- Lechner MD, Gehrke K, Nordmeier EH. 2010. Makromolekulare Chemie, Ein Lehrbuch für Chemiker, Physiker, Materialwissenschaftler und Verfahrenstechniker. Basel: Birkhäuser Verlag, 53.
- Lelong IH, Petegnief V, Rebel G. 1992. Neuronal cells mature faster on polyethyleneimine coated plates than on polylysine coated plates. *J Neurosci Res*, 32 (4):562-568.
- Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK, Montllor MM. 1989. The tension-free hernioplasty. *Am J Surg*, 157 (2):188-193.
- Liu B, Ma J, Gao E, He Y, Cui F, Xu Q. 2008. Development of an artificial neuronal network with post-mitotic rat fetal hippocampal cells by polyethylenimine. *Biosens Bioelectron*, 23 (8):1221-1228.
- Liu ZM, Lee SY, Sarun S, Peschel D, Groth T. 2009. Immobilization of poly (ethylene imine) on poly (L: -lactide) promotes MG63 cell proliferation and function. *J Mater Sci Mater Med*.
- Mark HF. 1968. Encyclopedia of Polymer Science and Technology: Molding to Petroleum resins. Interscience Publishers, 762.
- Mason WT. 1999. Fluorescent and luminescent probes for biological activity: a practical guide to technology for quantitative real-time analysis. Academic Press, 181-183.
- Mavros MN, Athanasiou S, Alexiou VG, Mitsikostas PK, Peppas G, Falagas ME. 2011. Risk factors for mesh-related infections after hernia repair surgery: a meta-analysis of cohort studies. *World J Surg*, 35 (11):2389-2398.
- Menges G, Haberstroh E, Michaeli W, Schmachtenberg E. 2002. Werkstoffkunde Kunststoffe. München, Wien: Carl Hanser Verlag, 27-86.
- Miserez M, Alexandre JH, Campanelli G, Corcione F, Cuccurullo D, Pascual MH, Hoferlin A, Kingsnorth AN, Mandala V, Palot JP, Schumpelick V, Simmermacher RK, Stoppa R, Flament JB. 2007. The European hernia society groin hernia classification: simple and easy to remember. *Hernia*, 11 (2):113-116.
- Misra MC, Bansal VK, Kulkarni MP, Pawar DK. 2006. Comparison of laparoscopic and open repair of incisional and primary ventral hernia: results of a prospective randomized study. *Surg Endosc*, 20 (12):1839-1845.
- Moby V, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel JC, Marchal L, Dumas D, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. 2007. Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts. *Biomacromolecules*, 8 (7):2156-2160.
- Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. 2005. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther*, 11 (6):990-995.

- Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y, Fumoto S, Yamashita F, Hashida M. 2003. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol Ther*, 7 (2):254-261.
- Morra M, Cassinelli C. 1999. Surface Studies on a Model Cell-Resistant System. *Langmuir*, 15 (13):4658-4663.
- Mulisch M, Welsch U. 2010. *Romeis- Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 37-38.
- Niepel MS, Peschel D, Sisquella X, Planell JA, Groth T. 2009. pH-dependent modulation of fibroblast adhesion on multilayers composed of poly(ethylene imine) and heparin. *Biomaterials*, 30 (28):4939-4947.
- Novitsky YW, Cristiano JA, Harrell AG, Newcomb W, Norton JH, Kercher KW, Heniford BT. 2008. Immunohistochemical analysis of host reaction to heavyweight-, reduced-weight-, and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)-based meshes after short- and long-term intraabdominal implantations. *Surg Endosc*, 22 (4):1070-1076.
- O'Dwyer PJ, Norrie J, Alani A, Walker A, Duffy F, Horgan P. 2006. Observation or operation for patients with an asymptomatic inguinal hernia: a randomized clinical trial. *Ann Surg*, 244 (2):167-173.
- Orenstein SB, Saberski ER, Kreutzer DL, Novitsky YW. 2011. Comparative Analysis of Histopathologic Effects of Synthetic Meshes Based on Material, Weight, and Pore Size in Mice. *J Surg Res*.
- Otto S. 2006. Epidemiologische und sozioökonomische Aspekte der Hernienchirurgie. In: Ritz J-P, Buhr HJ, Hrsg.: Springer-Verlag, 3-8.
- Prieto-Diaz-Chavez E, Medina-Chavez JL, Anaya-Prado R. 2009. A cost-effectiveness analysis of tension-free versus shouldice inguinal hernia repair: a randomized double-blind clinical trial. *Hernia*, 13 (3):233-238.
- Prokop A. 2011. *Intracellulär Delivery : Fundamentals and Applications*. Springer-Verlag, 615-621.
- Rao GA, Tsai R, Roura D, Hughes JA. 2008. Evaluation of the transfection property of a peptide ligand for the fibroblast growth factor receptor as part of PEGylated polyethylenimine polyplex. *J Drug Target*, 16 (1):79-89.
- Regnstrom K, Ragnarsson EG, Fryknas M, Koping-Hoggard M, Artursson P. 2006. Gene expression profiles in mouse lung tissue after administration of two cationic polymers used for nonviral gene delivery. *Pharm Res*, 23 (3):475-482.
- Reinhold W. 2012. *Aktuelle Entwicklung der Hernienchirurgie*. 2008.
- Reyes DR, Perruccio EM, Becerra SP, Locascio LE, Gaitan M. 2004. Micropatterning neuronal cells on polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 20 (20):8805-8811.
- Ritz J-P, Buhr HJ. 2006. *Hernienchirurgie, Klinische Strategien, operative Technik und perioperatives Management*. Berlin: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 35-36.
- Robinson TN, Clarke JH, Schoen J, Walsh MD. 2005. Major mesh-related complications following hernia repair: events reported to the Food and Drug Administration. *Surg Endosc*, 19 (12):1556-1560.
- Rösler J, Harders H, Bäker M. 2006. *Mechanisches Verhalten der Werkstoffe*. Wiesbaden: B.G. Teubner Verlag, 24-30.
- Rost FWD. 1995. *Fluorescence microscopy*. Cambridge University Press, 225-226.
- Saberski ER, Orenstein SB, Novitsky YW. 2011. Anisotropic evaluation of synthetic surgical meshes. *Hernia*, 15 (1):47-52.

- Scheidbach H, Wolff S, Lippert H. 2011. [Meshes in abdominal wall surgery - an overview]. *Zentralbl Chir*, 136 (6):568-574.
- Schmidbauer S, Ladurner R, Hallfeldt KK, Mussack T. 2005. Heavy-weight versus low-weight polypropylene meshes for open sublay mesh repair of incisional hernia. *Eur J Med Res*, 10 (6):247-253.
- Schumpelick V. 1997. Hernienchirurgie: Leistenhernien bei Erwachsenen und Kindern. *Dt Ärztebl* 1997; 94: A-3268-3276, [Heft 48].
- Schwarzl FR. 1990. Polymermechanik : Struktur und mechanisches Verhalten von Polymeren. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 75-76.
- Segut O. 2010. Electrochemically deposited polyethyleneimine films and their characterization. *Synthetic metals*, 160 (11):1359.
- Seifert B, Mihanetzi G, Groth T, Albrecht W, Richau K, Missirlis Y, Paul D, von Sengbusch G. 2002. Polyetherimide: a new membrane-forming polymer for biomedical applications. *Artif Organs*, 26 (2):189-199.
- Seiler C, Baumann P, Kienle P, Kuthe A, Kuhlitz J, Engemann R, M VF, Knaebel HP. 2010. A randomised, multi-centre, prospective, double blind pilot-study to evaluate safety and efficacy of the non-absorbable Optilene Mesh Elastic versus the partly absorbable Ultrapro Mesh for incisional hernia repair. *BMC Surg*, 10:21.
- Sergent F, Desilles N, Lacoume Y, Tuech JJ, Marie JP, Bunel C. 2010. Biomechanical analysis of polypropylene prosthetic implants for hernia repair: an experimental study. *Am J Surg*, 200 (3):406-412.
- Skoog DA, Leary JJ, Brendel D, Hoffstetter-Kuhn S. 1996. Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen. Springer, 389-414.
- Spencer ND. 2011. Tailoring Surfaces: Modifying Surface Composition and Structure for Applications in Tribology, Biology and Catalysis. WORLD SCIENTIFIC PUB, 64.
- Sun XF, Wang SG, Cheng W, Fan M, Tian BH, Gao BY, Li XM. 2011. Enhancement of acidic dye biosorption capacity on poly(ethylenimine) grafted anaerobic granular sludge. *J Hazard Mater*, 189 (1-2):27-33.
- Tamme C, Garde N, Klingler A, Hampe C, Wunder R, Kockerling F. 2005. Totally extraperitoneal inguinal hernioplasty with titanium-coated lightweight polypropylene mesh: early results. *Surg Endosc*, 19 (8):1125-1129.
- Teramura Y, Kaneda Y, Totani T, Iwata H. 2008. Behavior of synthetic polymers immobilized on a cell membrane. *Biomaterials*, 29 (10):1345-1355.
- Toda M, Kitazawa T, Hirata I, Hirano Y, Iwata H. 2008. Complement activation on surfaces carrying amino groups. *Biomaterials*, 29 (4):407-417.
- Tryoen-Toth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. 2002. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res*, 60 (4):657-667.
- Usher FC, Ochsner J, Tuttle LL, Jr. 1958. Use of marlex mesh in the repair of incisional hernias. *Am Surg*, 24 (12):969-974.
- Verma HR. 2007. Atomic and nuclear analytical methods: XRF, Mössbauer, XPS, NAA and ion-beam spectroscopic techniques. Springer, 213-241.
- Vissing KD. 2007. Aufskalierung plasmapolymerer Beschichtungsverfahren. Cuvillier Verlag, 38-39.
- Voskerician G, Gingras PH, Anderson JM. 2006. Macroporous condensed poly(tetrafluoroethylene). I. In vivo inflammatory response and healing characteristics. *J Biomed Mater Res A*, 76 (2):234-242.

- Voskerician G, Rodriguez A, Gingras PH. 2007. Macroporous condensed poly(tetra fluoroethylene). II. In vivo effect on adhesion formation and tissue integration. *J Biomed Mater Res A*, 82 (2):426-435.
- Weckhuysen BM, Voort P, Catana G. 2000. Spectroscopy of transition metal ions on surfaces. Leuven University Press, 269-299.
- Welsch MMuU. 2010. Romeis Mikroskopische Technik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 20-24.
- Welty G, Klinge U, Klosterhalfen B, Kasperk R, Schumpelick V. 2001. Functional impairment and complaints following incisional hernia repair with different polypropylene meshes. *Hernia*, 5 (3):142-147.
- Weyhe D, Hoffmann P, Belyaev O, Mros K, Muller C, Uhl W, Schmitz F. 2007. The role of TGF-beta1 as a determinant of foreign body reaction to alloplastic materials in rat fibroblast cultures: comparison of different commercially available polypropylene meshes for hernia repair. *Regul Pept*, 138 (1):10-14.
- Weyhe D, Belyaev O, Buettner G, Mros K, Mueller C, Meurer K, Papapostolou G, Uhl W. 2008. In vitro comparison of three different mesh constructions. *ANZ J Surg*, 78 (1-2):55-60.
- Wilkinson MHF, Schut F. 1998. Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry, and motility techniques and applications. Wiley, 431-467.
- Willibald Pschyrembel bvdW-R. 2011. Psychrembel - Klinisches Wörterbuch 2012 Berlin, Germany: Walter de Gruyter.
- Wintermantel E, Ha S-W. 2002. Medizintechnik mit biokompatiblen Wirkstoffen und Verfahren. Heidelberg: Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 25.
- Wintermantel E, Ha S-W. 2008. Medizintechnik Life Science Engineering. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 711-715.
- Witherspoon P, O'Dwyer PJ. 2005. Surgeon perspectives on options for ventral abdominal wall hernia repair: results of a postal questionnaire. *Hernia*, 9 (3):259-262.
- Witherspoon P, Bryson G, Wright DM, Reid R, O'Dwyer PJ. 2004. Carcinogenic potential of commonly used hernia repair prostheses in an experimental model. *Br J Surg*, 91 (3):368-372.
- Yang Y-F, Wan L-S, Xu Z-K. 2009. Surface hydrophilization of microporous polypropylene membrane by the interfacial crosslinking of polyethylenimine. *Journal of Membrane Science*, 337 (1-2):70-80.
- Zendejas B, Ramirez T, Jones T, Kuchena A, Martinez J, Ali SM, Lohse CM, Farley DR. 2012. Trends in the utilization of inguinal hernia repair techniques: a population-based study. *Am J Surg*.
- Zimmerman LM. 1963. External and internal abdominal hernias. *Am J Gastroenterol*, 40:405-410.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben, insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. U. Settmacher, Chefarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. K. D. Jandt, Lehrstuhl für Materialwissenschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und die Erlaubnis, die Arbeitsräume, Arbeitsgeräte und das Arbeitsmaterial im Labor des Institutes für Materialwissenschaft benutzen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Scheuerlein, Oberarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Jena und Herrn Dr. S. Zankovych, Mitarbeiter des Institutes für Materialwissenschaft und Werkstofftechnologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Ihr großes persönliches Engagement, die umfassende Betreuung und Beratung, sowie ihre Geduld und hilfreichen Anregungen haben diese Promotion erst möglich gemacht.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. M. Walther vom Institut für medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena für die hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung dieses Studium nicht möglich gewesen wäre, sowie bei meinen Freunden, die mir während der gesamten Zeit zur Seite standen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. U. Settmacher, Herr Prof. Dr. K. D. Jandt, Herr Dr. H. Scheuerlein, Herr Dr. S. Zankovych und Herr Dr. M. Walther,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift